

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital**

**Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein**

**Thema der Dissertation:**

**Einfluss mütterlicher Atopie auf die Funktion  
regulatorischer T- Zellen im Nabelschnurblut**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von  
Séverine Haug  
aus  
Rosenheim**

**2012**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter:** Priv. Doz. Dr. Bianca Schaub

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. Andreas Wollenberg  
Prof. Dr. Georg Enders  
Prof. Dr. Nadia Harbeck

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:** -----

**Dekan:** Herr Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser FACR, FRCR

**Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2012**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Prävalenz allergischer Erkrankungen .....	1
1.2 Atopie .....	2
1.3 Unspezifisches (angeborenes) Immunsystem.....	4
1.3.1 Endotoxin (LPS).....	5
1.3.2 Toll-Like-Rezeptoren.....	6
1.4 Spezifisches (erworbenes) Immunsystem.....	9
1.5 Regulatorische T-Zellen.....	12
<b>2 Probanden und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Probanden.....	15
2.2 Fragebögen und Einverständniserklärung .....	15
2.3 Methoden .....	16
2.3.1 Entnahme von Nabelschnurblut/EDTA-Blut .....	16
2.3.2 Zellkultur und Lymphozytenproliferation.....	16
2.3.3 Genexpression.....	18
2.3.3.1 RNA-Extraktion.....	18
2.3.3.2 cDNA-Präparation .....	19
2.3.3.3 Quantitative Real Time RT-PCR.....	19
2.3.3.3.1 Prinzip der PCR .....	19
2.3.3.3.2 Primerdesign.....	21
2.3.3.3.3 Berechnung für 30 µl Endvolumen pro Ansatz .....	21
2.3.3.3.4 Pipettierschema für PCR-Ansatz.....	22
2.3.3.3.5 iCycler-Protokoll für die Real Time RT-PCR.....	24
2.3.3.3.6 Gel-Elektrophorese .....	24
2.3.3.4 Datenanalyse der Real Time RT-PCR .....	26
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1 Die PAULINA-Studie.....	29

3.2	Studienteilnahme .....	29
3.3	Epidemiologische Charakteristika der Probanden.....	30
3.4	Proliferation von CBMCs atopischer (A) und nicht-atopischer (NA) Mütter.....	33
3.5	Expression von Treg-assoziierten Genen .....	35
3.6	Korrelationen in der Genexpression Treg-assoziiierter Gene.....	38
3.7	Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten im Nabelschnurblut (Durchflusszytometrie) .....	42
3.8	Zytokinsekretion bei CBMCs (A) nach Stimulation .....	42
3.9	Korrelation zwischen Zytokin IL10 und Treg-assoziierten Genen.....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
	<b>Danksagungen .....</b>	<b>65</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>66</b>
	PAULINA-Studie: Informationen für Eltern .....	66
	Fragebogen für die Mutter .....	67
	Einverständniserklärung .....	70
	Kreissaalinformation .....	71

# 1 Einleitung

## 1.1 Prävalenz allergischer Erkrankungen

Die Zunahme der Prävalenz allergischer Krankheitsbilder und die Manifestation von Atopie und Asthma bronchiale bei Kindern über einen Zeitraum der letzten 20 bis 30 Jahre hat zunehmend das Interesse geweckt, deren Ursachen zu erfassen und die beeinflussenden immunologischen Faktoren zu verstehen.

Besonders betroffen sind Kinder der westlichen Industrieländer mit hohem sozioökonomischem Entwicklungs- und Hygienestandard (Holt 2004); diese Erkenntnis beschrieb erstmals 1989 David Strachan in der sog. Hygienehypothese. Der britische Wissenschaftler hatte nachgewiesen, dass in Familien mit Kindern, die mehr als 4 ältere Geschwister hatten, die Manifestation von Heuschnupfen deutlich niedriger ausfiel als in kinderarmen Familien. D. Strachan und seine Mitarbeiter vermuteten, dass sich die Auseinandersetzung mit viralen Infekten bei den jüngeren Geschwistern als Schutzmechanismus gegenüber der Entwicklung von Allergien auswirkt. Bestätigt wurde diese Hypothese dann in den folgenden Jahren durch Studien aus den USA und Europa, die dasselbe für Kinder beschrieben, die im ersten Lebensjahr bereits in Kinderkrippen untergebracht wurden und somit schon frühzeitig in Kontakt mit zahlreichen anderen Kindern kommen und dabei mit Infektionen konfrontiert werden (Strachan, 1989).

Jedes dritte Kind ist bereits von behandlungsbedürftigen allergischen Krankheiten betroffen; Asthma bronchiale stellt eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter dar, und innerhalb Deutschlands konnte speziell in Ostdeutschland in den damals luftverschmutzten Industriegebieten innerhalb der letzten 20 Jahre nach der Wiedervereinigung eine deutliche Zunahme der zuvor wesentlich geringer verbreiteten Symptomatik des Heuschnupfens und der Sensibilisierung gegenüber atopischen Leiden festgestellt werden (Ehrenstein et al. 2000). Neben diesen Beobachtungen deutet auch der Nachweis, dass Kinder, die aus landwirtschaftlich tätigen Familien stammen, sog. Bauernkinder, eine geringere Manifestation allergischer Rhinitis und Asthma bronchiale aufwiesen, darauf hin, dass Lebensstil und Exposition gegenüber natürlichen Umweltfaktoren bereits in der frühen Kindheit und in der Schwangerschaft eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Krankheitsbilder spielen. Die Manifestation dieser Erkrankungen bereits in der frühen Kindheit und die Tatsache, dass auch der Zeitpunkt und das Ausmaß der Auseinandersetzung mit Allergenen und Endotoxinen einen gra-

vierenden Einfluss auf immunologische Reifungsprozesse und deren Regulation nehmen, stellte das angeborene Immunsystem und dessen Erkennungsfunktion für mikrobielle Stimuli in den Vordergrund der Forschung der Allergo-Immunologie (Braun-Fahrlander et al. 2002, Ehrenstein et al. 2000).

Dabei werden Atopie und Umweltfaktoren folgendermaßen in Zusammenhang gebracht: Neugeborene weisen primär ein Übergewicht von T-Zellen des TH-2 Typs auf, postnatal entsteht eine durch TH-1-Zellen vermittelte Reaktionslage; diese Umkehr von TH-2 auf TH-1 wird möglicherweise auf ablaufende Infektionen und damit auf Bakterien zurückgeführt, geht jedoch auch ohne diese „Trigger“ von staten. Dabei werden eingedrungene Pathogene phagozytiert und es kommt letztendlich zur Sekretion von IL12, das wiederum eine TH-1-gewichtete Immunlage mit Produktion des TH-1-Zytokins Interferon-gamma nach sich zieht. Gleichzeitig wird dadurch die Entwicklung von TH-2-Zellen, die allergische Reaktionen fördern, gehemmt.

Ziel ist es, ein besseres Verständnis immunologischer Mechanismen in der frühen Immunentwicklung zu erlangen und somit langfristig die Entwicklung allergischer Erkrankungen besser zu charakterisieren.

## 1.2 Atopie

Die drei Komponenten allergische Rhinitis, Asthma bronchiale und atopische Dermatitis (Ekzem) werden unter dem Begriff „Atopie“ zusammengefasst, welcher die Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp der allergischen Reaktionen (Typ I nach Coombs and Gell) beschreibt.

Dem Krankheitsbild des atopischen Formenkreises liegt u.a. eine genetische Disposition zugrunde, die zu einer Kombination von klinischen Merkmalen, wie dem extrinsischen (allergischen) Asthma bronchiale, der allergischen Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen) und der atopischen Dermatitis (atopisches Ekzem) und zu allergischer Enteritis sowie zur selteneren Urtikaria führen kann.

Die Diagnose der Atopie wird nicht durch ein einzelnes klinisches Zeichen bestimmt. Eine multifaktorielle Genese liegt dem zu Grunde; das bedeutet, dass die Diagnosestellung aus verschiedenen allergisch getriggerten Krankheitsleiden sowie aus der Patienten- und Familienanamnese resultiert, einschließlich der Labordiagnostik der spezifischen Serum-IgE-Konzentration.

Atemwegserkrankungen gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter. In der Bundesrepublik Deutschland leiden 15% aller unter 15 Jahre alten Kindern an chronischem Asthma bronchiale (Köllges, ohne Jahresangabe).

Beim Asthma bronchiale unterscheidet man eine extrinsische Form von einer intrinsischen Form: Extrinsisches Asthma bronchiale, auch als allergisches Asthma bronchiale bezeichnet, wird durch Allergene in der Umwelt ausgelöst. Die intrinsische, nicht-allergische Form wird im Gegensatz dazu durch Atemwegsinfektionen, chemisch-irritativ toxische Substanzen, gastroösophagealen Reflux, körperliche Belastung (v. a. bei Kindern und Jugendlichen) und durch Analgetika (Acetylsalicylsäure) ausgelöst.

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine entzündliche Atemwegserkrankung, die durch eine Trias von Merkmalen definiert ist. Dazu gehören die variable und reversible Atemwegsobstruktion, Ödembildung der Schleimhaut und die Dyskrie mit Mukostase.

Eine Hyperreagibilität des Bronchialsystems und dessen Mucosa ist Voraussetzung für die Manifestation des Asthmas bronchiale. Die Überempfindlichkeit beim allergischen Asthma beruht wiederum auf allergischen Reaktionen des Atmungstraktes gegenüber inhalativen Allergenen, viralen Erregern und chemisch irritativen Noxen. Diese Stimuli lösen eine Entzündungsreaktion der Schleimhaut aus. Über Guanosin-Protein gekoppelte Histamin-1-Rezeptoren (H1-Rezeptoren) wird über die Signaltransduktion mit Hilfe der beiden Enzyme Phospholipase C und Proteinkinase C die Bildung eines sog.  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplexes und eine Myosinphosphorylierung ausgelöst, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur besonders in den Bronchien der Lunge und eine damit einhergehende Engstellung des Bronchiallumens zur Folge haben.

Der primären, durch IgE vermittelten Bronchokonstriktion folgt zu späterem Zeitpunkt eine sekundäre persistierende Engstellung der Bronchien. Diese wird durch TH-2-Zellen und deren Zytokine verursacht; die durch die TH-2-Zellen aktivierten eosinophilen Granulozyten infiltrieren und schädigen die Mucosa der Atemwege und bahnen damit die Hyperreagibilität des gesamten Bronchialsystems auf Aeroallergene und den Schweregrad des manifesten Asthma bronchiale (Strickland et al. 2006).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bildung von Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$  = Endothelium derived relaxing factor = EDRF) in Endothelzellen von Blutgefäßen führt zu einer Relaxation der sich in der Gefäßwand befindlichen glatten Muskelzellen und einer damit einhergehenden Gefäßdilatation, die zusammen mit einer durch Interleukin und Histamin verursachten gesteigerten Durchblutung und erhöhten Gefäßpermeabilität zu Ödemen und Schwellungen (Urtikaria) der Haut und des Gewebes führt.

Symptome wie akut auftretende Dyspnoe, Obstruktion, giemende und pfeifende expiratorische Atemgeräusche und Tachykardie weisen auf asthmatische Reaktionen hin. Dies kann zu einem Status asthmaticus führen oder Komplikationen wie respiratorische Insuffizienz und Rechtsherzbelastung nach sich ziehen.

### 1.3 Unspezifisches (angeborenes) Immunsystem

**Das unspezifische Immunsystem** ist ein universelles Abwehrsystem, das seit Millionen von Jahren der Abwehr und Bekämpfung von Pathogenen dient. Nachgewiesen wurde es in Pflanzen und wirbellosen Tieren (Modlin/Brightbill/Godowski 1999, Takeda/Akira 2001).

Vermittelt wird diese Form von Abwehr durch das monozytäre Makrophagensystem; diesem gehören in der Blutbahn zirkulierende Monozyten, Makrophagen in diversen Geweben des Organismus und die Granulozyten an; alle diese Zellen zeichnen sich durch ihre Phagozytosefähigkeit aus.

Voraussetzung für die Induktion einer adäquaten Immunantwort, die letztendlich zur definitiven Beseitigung des in den Organismus eingedrungenen Pathogens führen soll, ist die Fähigkeit zur Erkennung von auf der Bakterienoberfläche liegenden Makromolekülen, den sogenannten Pathogenitätsfaktoren. Die Wissenschaft gewinnt zunehmend an detaillierten Erkenntnissen, die die molekulare Basis dieser Erkennungsprozesse beschreiben.

Die am 3. Oktober 2011 mit dem Medizin-Nobelpreis geehrten Immunologen Bruce Beutler (USA), Ralph Steinman (Kanada; † 30.09.2011) und Jules Hoffmann (Luxemburg) haben mit ihren Forschungsarbeiten und Erkenntnissen zum menschlichen Immunsystem, dessen Rezeptoren und spezifischen Zellen (dendritische Zellen) das Verständnis für das Immunsystem revolutioniert. B. Beutler und J. Hoffmann haben das angeborene Immunsystem mit seinen Rezeptorproteinen entdeckt und R. Steinman entdeckte und beschrieb 1973 die dendritischen Zellen als wichtige antigenpräsentierende Zellen. Alle drei haben Schlüsselprinzipien des Immunsystems erforscht und damit weiteren Studien, neuen Therapieansätzen bei Entzündungsprozessen, Infektionen und Karzinomen sowie für prophylaktische Maßnahmen (Impfungen) bedeutende und grundlegende Aspekte zur Weiterentwicklung vermittelt.

Das angeborene Immunsystem kann mit Hilfe von sogenannten *pattern-recognition-Rezeptoren*, Merkmale auf der Zelloberfläche erkennen. Das sind Rezeptoren mit der Fähigkeit körperfremdes und infektiöses Protein gegenüber körpereigenem zu unterscheiden. Diese Funktion und Fähigkeit läuft grundsätzlich antigenunabhängig ab, d.h. unabhängig von der Art des schädigenden Agens und wird durch die sog. *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR) und bei lipidhaltigen Liganden, wie Lipopolysacchariden durch den Rezeptor CD14 vermittelt. Dabei werden mikrobiell konservierte Strukturmerkmale, wie z.B. das LpA, die auf bakteriellen Oberflächenmolekülen der eingedrungenen Mikroorganismen lokalisiert sind und als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) be-



zeichnet werden, durch die TLR erkannt, gebunden und schließlich phagozytiert; speziell die TLR, nicht jedoch CD14, setzen dann zelluläre Signalkaskaden zur Aktivierung der Zytokinsekretion und des spezifischen Immunsystems in Gang (Modlin/Brightbill/Godowski 1999).

Das angeborene, unspezifische Immunsystem und dessen „Schlüsselrezeptoren“, die *Toll-Like-Rezeptoren*, ermöglichen somit eine effiziente Abwehr, bevor das spezifische Immunsystem aktiv wird und wirken gleichzeitig als eine Art Informationssystem für die spezifische, erworbene Abwehr. Diese wird durch die Freisetzung von Zytokinen und durch die Expression von costimulierenden Molekülen aktiviert.

### 1.3.1 Endotoxin (LPS)

Bestandteile der Zellwand gramnegativer und grampositiver Bakterien, wie beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS), Lipopeptide bzw. -proteine (LP), Peptidoglycan (Ppg) und Lipoteichonsäure (LTA), aber auch bakterielle DNA (CpG-Motive) und virale RNA (dsRNA) sind starke Aktivatoren des unspezifischen Immunsystems. Die wesentlichen Zielzellen, die diese molekularen Bestandteile binden und damit erkennen, sind die dendritischen Zellen und Monozyten, welche die Molekülstrukturen über ihren CD14-Rezeptor binden.

Gramnegative Bakterien werden anhand des exponierten Oberflächenantigens Endotoxin erkannt.

Der Begriff „Endotoxin“ wurde 1904 von Richard Pfeiffer, einem Schüler von Robert Koch begründet. In Tierversuchen entdeckte er neben dem hitzelabilen Exotoxin auch eine hitzestabile Komponente, das Endotoxin, das beim Zugrundegehen des Bakteriums *Vibrio cholerae* freigesetzt wird (Liebers/Raulf-Heimsoth 2003).

Endotoxin, welches biochemisch ein Lipopolysaccharid (LPS) darstellt, bestehend aus unterschiedlichen Polysaccharidketten und einem relativ einheitlich strukturierten Lipid, dem bioaktiven Lipid A und liegt in der Zellwand von gramnegativen Bakterien und Blaualgen vor. Die Begriffe Lipopolysaccharid und Endotoxin werden meist synonym verwendet.

Die toxische und damit Krankheit verursachende Wirkung der Lipopolysaccharide geht von der Lipidkomponente aus.

Der Grad der Auswirkung von Endotoxinkontakt auf den jeweiligen Organismus hängt von verschiedenen Faktoren ab, so beispielsweise von der Eintrittspforte bzw. dem Angriffsort, von der Konzentration und dem Zeitpunkt der Exposition und von der Disposition des betroffenen Individuums.

Rylander beschreibt Reaktionen bzw. Symptome in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Exposition gegenüber LPS; dabei unterscheidet er zwischen akuten Effekten nach einmaliger Exposition, Effekten nach wiederholter Exposition über einen längeren Zeitraum und Effekten nach gleichzeitiger Exposition gegenüber Endotoxin und anderen Substanzen (ebd.).

Endotoxinkontakt entsteht beispielsweise durch Inhalation von Bioaerosolen in Bronchien und Alveolen der Lunge. Sowohl in partikulärer als auch in gelöster Form trifft das Toxin auf Alveolarmakrophagen. Ein Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) vermittelt die Affinität zwischen LPS und CD14-Rezeptoren, die sowohl zellständig als auch in gelöster Form als sCD14 vorliegen. Somit kann LPS auch an Epithelzellen gebunden werden, die kein CD14 exprimieren.

In der Kausalkette zwischen CD14-LPS-Bindung und der Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren stehen die sog. *Toll-Like-Rezeptoren (TLR)*. In Zusammenhang mit Endotoxin steht hier der TLR4 im Vordergrund. Im Anschluss an die Phagozytose des LPS durch Makrophagen, werden die Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL6), Interferon gamma (IFN gamma) und Interleukin 8 (IL8) freigesetzt. Eine Entzündungsreaktion, begleitet von Chemokinen wie Thromboxan, Leukotrienen, Prostaglandinen und Plättchen-aktivierendem Faktor als Aktivatoren weiterer immunkompetenter Blutzellen wird in Gang gesetzt. Die Diapedese (Einwanderung) von polymorphkernigen Leukozyten als zytotoxische Fresszellen in die Lunge ist die Folge der vorangegangenen Vorgänge (ebd.).

Die positiven Wirkungen von Endotoxin hinsichtlich der Genese atopischer Erkrankungen wurden vielfach untersucht. Auf Basis der Erkenntnis, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufgewachsen sind, eine signifikant geringere Ausprägung von Atopie aufweisen, wurden Endotoxinmessungen bei ländlichen und städtischen Haushalten durchgeführt. Es zeigten sich signifikant höhere Werte im Haushalt und in den Matratzen von Bauernfamilien. Ähnlich wie durch die Polymorphismen von CD14 kann durch Endotoxinkontakt in entsprechend hohen Dosen und bereits zum Zeitpunkt der frühen Kindheit die Serum-IgE-Konzentration und dadurch die allergische Prädisposition möglicherweise reduziert werden (Mutius et al. 2000).

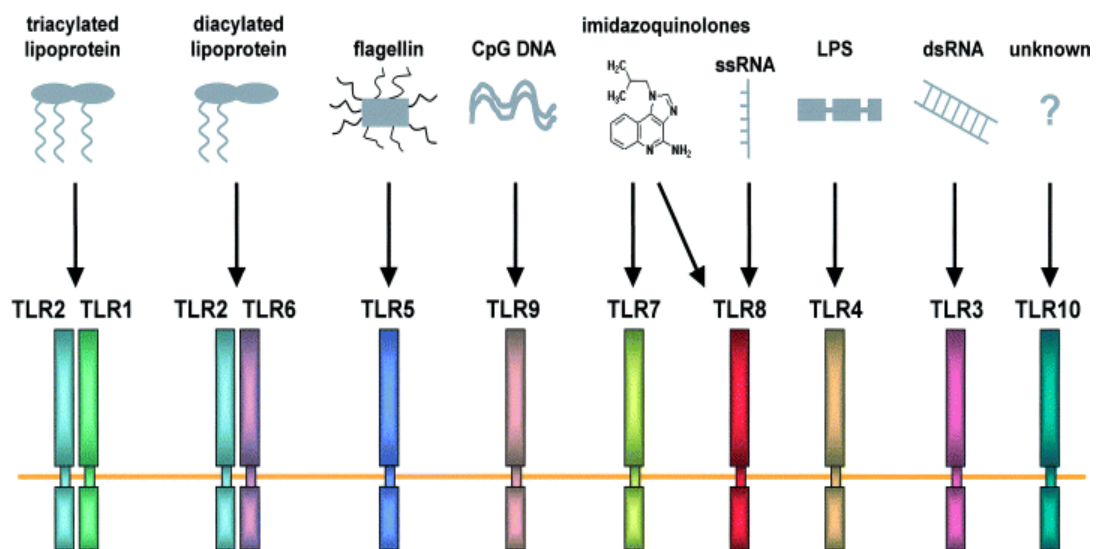
### 1.3.2 Toll-Like-Rezeptoren

Innerhalb der letzten Jahre wurde die Familie der *Toll-Like-Rezeptoren* entdeckt; diese Rezeptorart spielt für das angeborene (unspezifische) Immunsystem und damit bei der ersten Abwehr des Organismus gegen Pathogene eine sehr bedeutende Rolle.

Es handelt sich dabei um 10 Rezeptoren, die mit den Ziffern 1-10 benannt wurden und in einer Schlüsselposition bei der bereits beschriebenen Erkennungsfunktion von verschiedenen molekularen Oberflächenstrukturen durch das angeborene Immunsystem mitwirken. Die Weiterleitung der entsprechenden Signale von der Zelloberfläche in das Zellinnere, den Bereich des Zytoplasmas, wird dabei durch die *Toll-Like-Rezeptoren* ermöglicht.

Der Name dieser Rezeptorgruppe wurde von dem ursprünglich bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Rezeptor „*Toll*“ abgeleitet, der bei diesem Insekt für die Entwicklung der dorso-ventralen Achse der Larve mitverantwortlich ist und darüber hinaus beim adulten Tier für die Immunantwort auf Pilzinfektionen durch die Produktion von Dorsomycin essentiell ist. Es handelt sich im Organismus des Säugetiers und damit auch des Menschen um Homologe dieser Rezeptorproteine, von welchen bereits 10 TLR kloniert wurden; für alle (außer für TLR10) wurden in den letzten 5 Jahren bereits Liganden beschrieben (Abbildung 1). Die beiden Proteine TLR4 und TLR2 sind die derzeit die am besten charakterisierten. Die Abbildung gibt einen Überblick dazu.

Abbildung 1: Toll-Like-Rezeptoren und Liganden

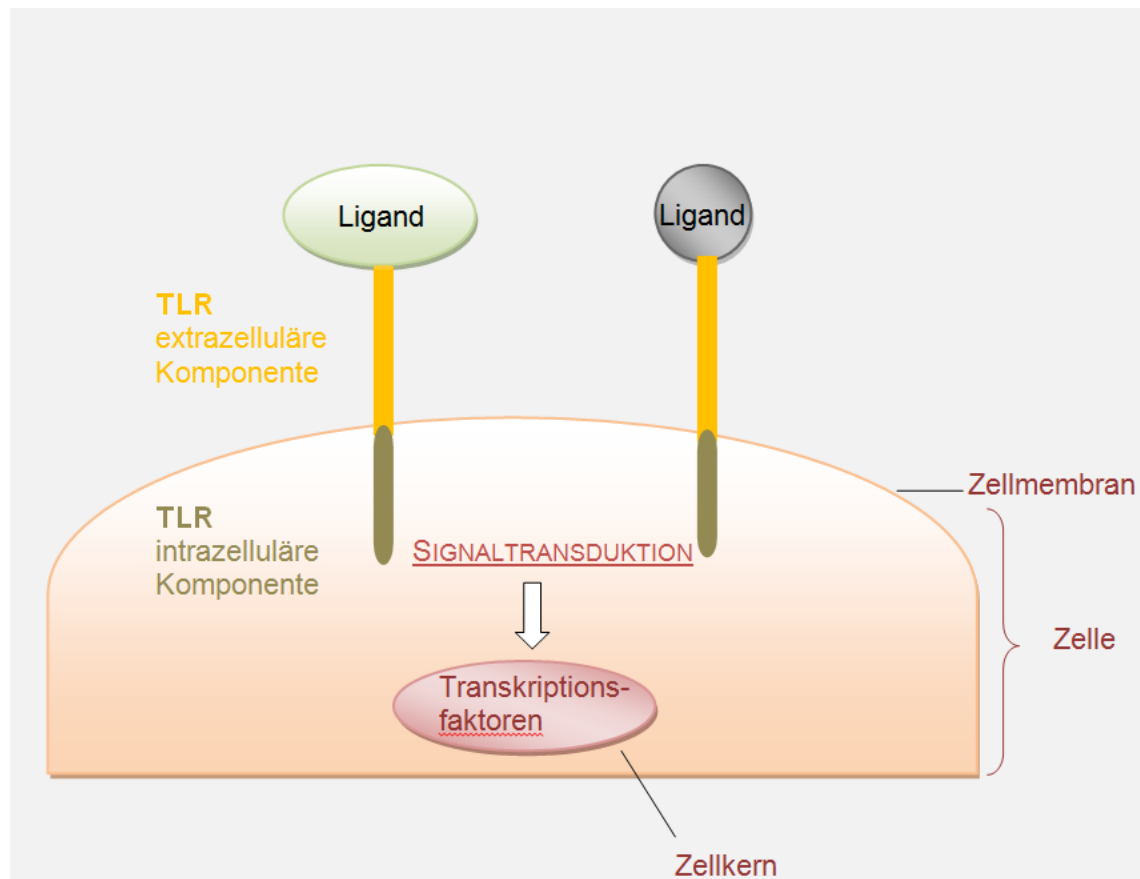


Quelle: McInturff, 2005

Es handelt sich bei diesen Rezeptoren um sog. transmembranäre Proteine, die sich aus einer extrazellulären und einer zytoplasmatischen Komponente zusammensetzen. Lokalisiert sind sie an der Zelloberfläche von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und sog. regulatorischen T-Zellen. Der extrazelluläre Anteil wird durch sich wiederholende leucin-reiche Motive beschrieben und weist damit Ähnlichkeit zu

anderen Rezeptoren mit Erkennungsfunktion auf. Die zytoplasmatische Struktur ist homolog zu Interleukin-1-Rezeptoren und dient der Vermittlung einer Signaltransduktion, welche in Abbildung 2 schematisch dargestellt wird (Modlin/Brightbill/Godowski 1999).

Abbildung 2: TLR mit Liganden und Signaltransduktion



Die Aktivierung der *Toll-Like-Rezeptoren* führt zu einer jeweils spezifischen Signalkaskade, verbunden mit Rekrutierung von Adapterproteinen und so genannten costimulierenden Molekülen, wie CD80 und CD86. Diese Signalkaskaden haben das Resultat der Induktion von Genen im Zellkern, der Auslösung inflammatorischer Reaktionen und der Produktion von Zytokinen zur Folge. Nach Aktivierung der *Toll-Like-Rezeptoren* kommt es zur Aktivierung von Adapterproteinen, die sich an die intrazellulären Domänen der TLR anlagern. Das zentrale Adaptermolekül der TLRs ist MyD88. Nach Rekrutierung von MyD88 kommt es durch mehrere Proteinkinasekaskaden zur Phosphorylierung des Inhibitionsfaktors I $\kappa$ B-alpha, wodurch sich dieser Inhibitor von dem Transkriptionsfaktor NF-kappa B (Nukleotidfaktor) löst und dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht und damit die Expression von Genen, Zytokinen und Proteinen beeinflusst (Takeda/Akira 2001).

Die Rezeptoren TLR2 und 4 sowie die strukturell den TLR ähnlichen *Nod-Like-Rezeptoren (NOD)* und ihre Agonisten Peptidoglycan (TLR2 und NOD1 & 2) und Lipopolysaccharid bzw. Lipid A (TLR4) wurden als Schlüsselrezeptoren bei der Entstehung von entzündlichen Reaktionen im Rahmen von Asthma bronchiale und Atopie erkannt. Durch die mikrobielle Stimulation dieser Rezeptoren wird das angeborene Immunsystem aktiviert und die spezifische Immunreaktion beeinflusst (Fritz et al. 2006).

Velasco et al. haben 2005 im Mausmodell nachgewiesen, dass die Exposition gegenüber mikrobiellen Liganden dieser Rezeptoren zu einer reduzierten Infiltration der Mucosa des Bronchialsystems mit eosinophilen Granulozyten führte und dass bereits vor stattgehabter Allergen-Sensibilisierung generelle allergeninduzierte Reaktionen wie IL13 Sekretion, Anstieg des Gesamt IgE im Serum und Ausprägung von bronchialer Hyperreagibilität vermindert werden können (Velasco et al., 2005).

Außerdem wurde in epidemiologischen Studien ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber bakteriellen Stimuli und der damit deutlich erniedrigten Prävalenz von Asthma bronchiale im Kindesalter beschrieben (Braun-Fahrlander et al. 2002, Ehrenstein et al. 2000).

Polymorphismen dieser *Toll-Like-Rezeptoren* werden als genetisch bedingte Ursache der unterschiedlich ausgeprägten Endotoxinempfindlichkeit des Menschen diskutiert. Varianten in den zugrundeliegenden TLR-Genen könnten dadurch ebenfalls das Risiko und den Ausprägungsgrad des Asthma bronchiale maßgeblich beeinflussen, da die durch Lipopolysaccharid-Exposition sowohl lokal als auch systemisch initiierten Entzündungsreaktionen beispielsweise aufgrund mutationsbedingter unterbrochener Zell-signale nicht mehr getriggert werden (Werner et al. 2003). Im Nabelschnurblut atopischer Mütter konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Polymorphismen der TLR2, 1 und 10 eine erniedrigte Genexpression Treg-assoziiierter Gene wie FoxP3, GITR (TNFSF18) und LAG3 zur Folge haben. Das lässt vermuten, dass durch das Vorliegen von mütterlicher Atopie das frühkindliche Immunsystem über die *Toll-Like-Rezeptoren*, deren genetische Varianten und die daraus resultierenden Signalwege beeinflusst werden (Liu et al. 2011).

## 1.4 Spezifisches (erworbenes) Immunsystem

Das **spezifische Immunsystem** geht aus der lymphatischen Zellreihe, den Lymphozyten, hervor. Diese Zellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks und wandern vom Ort der Entstehung in Form naiver Lymphozyten zur vollständigen Reifung zu kompetenten Immunzellen in den Thymus oder in das sog. Bursa-Äquivalent, welche beide die primären lymphatischen Organe darstellen. Nur ein

geringer Anteil der lymphatischen Zellen befindet sich in der Blutbahn, ihr größter Anteil liegt nach entsprechender Reifung in den sekundären lymphatischen Organen wie Milz, Leber, Lymphknoten, Tonsillen und in der Tunica mucosa des Gastrointestinaltraktes vor.

Zwei funktionelle Zelltypen werden innerhalb dieser lymphatischen Zellen unterschieden. Dies sind die aus dem Thymus stammenden T-Lymphozyten und zum anderen die B-Lymphozyten, welche aus dem Knochenmark stammen. Im Thymus reifen naive, aus dem Knochenmark eingewanderte Lymphozyten antigen-unabhängig heran und lernen körperfremdes Material von körpereigenen Strukturen zu differenzieren. Die B-Lymphozyten reifen in bestimmten Knochenmarkanteilen ebenfalls antigen-unabhängig heran.

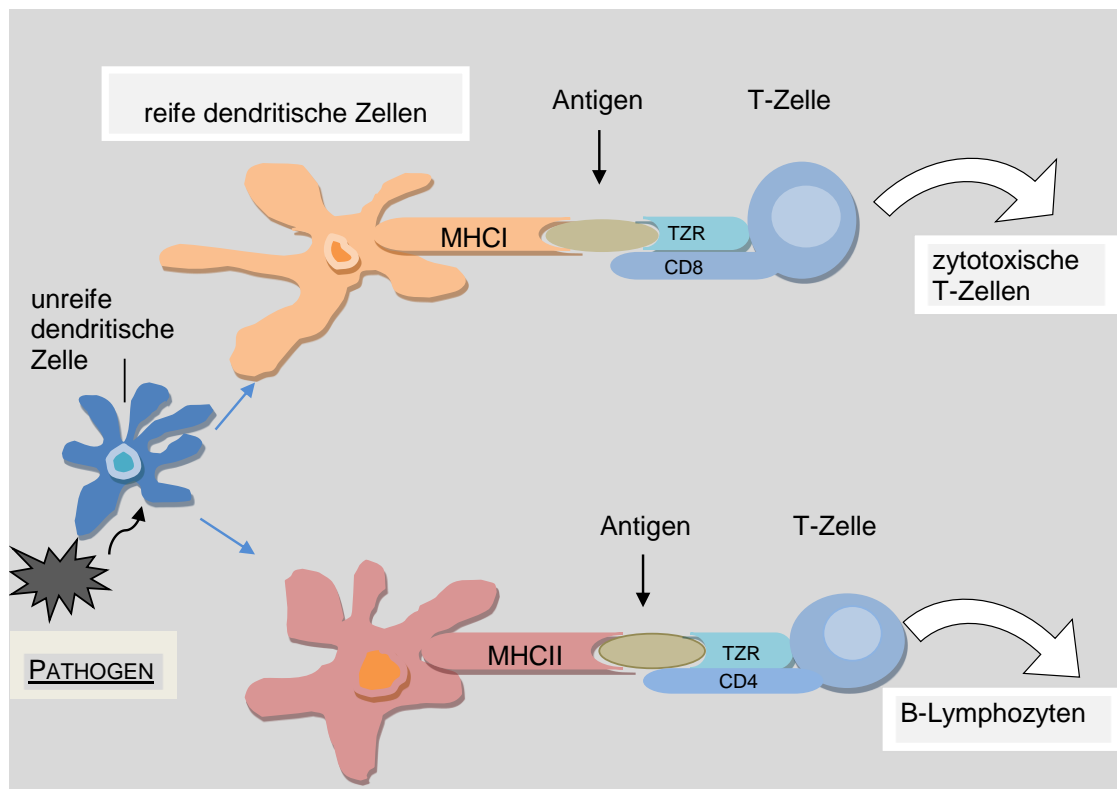
Die T-Zellen vermitteln die so genannte spezifische zelluläre Immunabwehr. Sie müssen jedoch durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden. Diese Antigenpräsentation durch Phagozytosezellen ist an Oberflächenmoleküle auf deren Zelloberfläche gebunden, die eine Selbst- bzw. Fremdunterscheidung ermöglichen.

Diese Moleküle fungieren dabei als Rezeptoren und werden als *major-histocompatibility-complex (MHC)* bzw. als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet.

Der T-Zell-Rezeptor (TZR) auf den T-Lymphozyten und weitere Molekülstrukturen, wie die jeweiligen *cluster of differentiation (CD)*-Rezeptoren, dienen der Differenzierung der T-Zellen, der Erkennung von MHC auf den antigenpräsentierenden Zellen einschließlich dem darauf präsentierten Fremdprotein (Abbildung 3).

Je nach Rezeptor auf der Zelloberfläche der T-Zellen wird zwischen den CD4+ - Zellen (T-Helfer-Zellen) und den CD8+ - Zellen (zytotoxischen T-Zellen) unterschieden. Beide repräsentieren verschiedene Aufgaben. Die CD4+ - Zellen unterstützen die sog. humorale Immunantwort, indem sie die Differenzierung der B-Lymphozyten in Antikörper produzierende Plasmazellen fördern. Dabei erkennt CD4+ das durch den Makrophagen mit MHC-II-Rezeptoren präsentierte prozessierte körperfremde Protein und sezerniert das Interleukin IL2. CD8+ - Zellen präsentieren phagozytiertes Material auf ihrer Zelloberfläche mit Hilfe von MHC I, das sich auf allen kernhaltigen Zellen befindet. Die zytotoxischen Zellen haben zudem eine sehr wichtige Funktion, die in der direkten Vernichtung körperfremder sowie körpereigener infizierter oder durch Tumorstadium veränderter Zellen besteht.

Abbildung 3: Antigenpräsentation durch MHC I und II &amp; T-Zell-Aktivierung



Ferner werden die T-Zellen noch nach ihrem Zytokinprofil und anhand von Oberflächenrezeptoren, CD4 und CD8 in die Subtypen TH-1-Zellen und TH-2-Zellen unterteilt. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Gruppen von T-Helfer-Zellen spielt eine wichtige Rolle in der Ätiologie allergischer Reaktionen und atopischer Erkrankungen. Die TH-2-Zellen zeigen antiinflammatorische und proallergische Wirkungen durch die Produktion von Interleukinen IL3, IL4, IL5, IL6 und IL13. Dieser Zelltyp liegt bei Asthma bronchiale und allergischen Krankheitsbildern vermehrt vor.

Die TH-1-Zellen wirken dagegen proinflammatorisch und antiallergisch und stimulieren Makrophagen; sie sezernieren dazu Interferon gamma (IFN-gamma), Interleukin IL2, IL10, IL12 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

Neben der zellulär spezifischen Immunabwehr, die durch T-Lymphozyten ausgeübt wird, gibt es noch die durch B-Lymphozyten vertretene humorale spezifische Abwehrfunktion.

Dabei fungieren die B-Lymphozyten als Phagozytosezellen für Antigen-Antikörperkomplexe, die durch Bindung eines Antigens an einem spezifischen Antikörper (IgM oder IgD) auf der B-Zell-Oberfläche entstanden sind. Nach Phagozytose der Antigen-Antikörper-Partikel werden mit Hilfe von MHC-II-Rezeptoren Proteinbruchstücke auf der B-Zelle präsentiert, T-Helferzellen aktiviert und eine durch IL2 getriggerte

Differenzierung der B-Zelle in eine antikörperproduzierende Plasmazellen eingeleitet (Buchta/Sönnichsen 2003).

## 1.5 Regulatorische T-Zellen

Eine weitere Subpopulation der T-Lymphozyten wird neben der bereits beschriebenen Gruppe der T-Helfer-Zellen durch die regulatorischen T-Zellen (Tregs), die früher als Suppressorzellen bezeichnet wurden, gebildet (Thompson & Powrie 2004).

Die Tregs stellen aufgrund ihrer bereits innerhalb der letzten zehn Jahre bekannt gewordenen Fähigkeit, Autoimmunerkrankungen zu verhindern und Homöostase im Immunsystem maßgeblich zu beeinflussen, einen Hauptfokus in den Bemühungen der aktuellen weltweiten Grundlagenforschung der Immunologie und Allergologie dar.

Neben der „Suppressor“-Funktion wirken sie auch in der Initialisierung von Immunantworten mit und repräsentieren dabei nicht nur eine bremsende und unterdrückende Aufgabe, sondern vielmehr tragen sie eine Schlüsselfunktion in der Selbsttoleranz und dem immunologischen Gleichgewicht eines Organismus – somit wird verständlich weshalb sie heute in der Literatur mit dem aussagekräftigeren Begriff „regulatorisch“ charakterisiert werden.

Auch im Zusammenhang mit den regulatorischen T-Zellen spielt der Thymus eine wichtige Rolle. In diesem reifen, wie im Absatz spezifisches Immunsystem erläutert, naive T-Helfer-Zellen heran, indem sie dort die Fähigkeit zur Differenzierung von „Selbst und Fremd“ internalisieren; T-Zellen, die diese Unterscheidung nicht können, werden zum Großteil eliminiert.

Man unterscheidet dabei zwei Gruppen von regulatorischen T-Zellen, die natürlichen Tregs und die induzierbaren peripheren Tregs. Die natürlichen Tregs stammen aus der Thymusdrüse (Marinic et al. 2006). Der Beweis dafür liegt in der Feststellung, dass Mäuse, die drei Tage postpartal thymektomiert wurden, Autoimmunerkrankungen entwickelten, adulte Mäuse dagegen, die ebenfalls, aber zeitlich eben später einer Thymektomie unterzogen wurden, keine autoimmunologischen Reaktionen zeigten. Zusätzlich erkannte man, dass die in den ersten Lebenstagen thymektomierten Mäuse eine reduzierte, aber trotzdem noch deutlich nachweisbare Anzahl von Tregs aufwiesen. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass regulatorische T-Lymphozyten erst in der späteren Neonatalperiode verstärkt produziert werden (Fontenot/Rudensky 2005).

Diese Gruppe der Tregs bewirken ihre immunologische Modulation durch direkten zellulären Kontakt und das Zytokin TGF $\beta$ ; dabei werden sie durch den T-Zell-Rezeptor



antigenunabhängig aktiviert. Die peripheren, adaptiven regulatorischen T-Zellen, nimmt man an, entstehen aus aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, nach Kontakt mit dem durch die antigenpräsentierende Zelle präsentierten Antigen. Die adaptiven Tregs wirken peripher durch ihre sezernierten Zytokine, wie Interleukin10 und TGFβ (Kavanagh et al. 2008, Marinic et al. 2006).

Die Identifikation bzw. Unterscheidung der einzelnen Subpopulationen der T-Zellen wird durch Strukturen an ihrer Zelloberfläche und intrazelluläre Moleküle ermöglicht. Regulatorische T-Zellen werden anhand ihrer Oberflächenrezeptoren CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> von anderen T-Zellreihen differenziert. Aus diesem Grund werden die regulatorischen T-Lymphozyten auch als „CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>hoch“-T-Zellen bezeichnet. Jedoch weisen auch andere nicht-regulatorische Immunzellen, speziell bei immunologischer Aktivierung, eine zunehmende Expression des CD25 Rezeptormoleküls auf und eine sichere Differenzierung der Tregs ist damit nicht mehr gewährleistet (Fontenot/Rudensky 2005).

Ein wichtiger und vor allem hochspezifischer Marker der „CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>hoch“- T-Zellen ist *Forkhead Box P3* (FoxP3), ein im Zellkern lokalisierter Transkriptionsfaktor aus der großen *forkhead/winged-helix* (Fox) Familie.

Neben der Charakterisierung der Suppressor-Zellen trägt FoxP3 aber auch zum Funktionserhalt dieser Zellgruppe nach Zellteilung bei. Die Funktion und die Ausprägung von FoxP3 in Tochterzellen von Tregs bleiben unverändert, durch die Modifikation von DNA-Abschnitten und deren Verpackungsstrukturen in einer sogenannten offenen Form (epigenetische Modifikation). Diese ermöglicht einfaches Ablesen der DNA-Information und damit die Weitergabe an die aus der Zellteilung hervorgehenden Tochterzellen mit denselben regulatorischen Funktionen wie in den vorherigen Zellgenerationen. Die Funktion von FoxP3 als Transkriptionsfaktor liegt im Ablesen von Genen, welche die Immunregulation ermöglichen.

Da andere immunkompetente Zellen FoxP3 nicht aufweisen, dient dieser Transkriptionsfaktor als spezifisches Markermolekül der regulatorischen T-Zellen. Manchmal werden diese T-Zellen somit in der Literatur auch als „CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>“ T-Zellen beschrieben.

Die Mutation von FoxP3 ist ebenfalls mit schweren autoimmunologischen Erkrankungen, wie dem IPEX-Syndrom (Polyendokrinopathie und Enteropathie mit psoriasiformer Hautveränderung) und der Beeinflussung von Alterungsprozessen assoziiert (Fontenot/Rudensky 2005).

Andere nicht spezifische Marker der Tregs sind GITR (TNFRSF18) und CTLA4. Diese Gene werden im weiteren Verlauf noch ausführlich beschrieben. Die Nomenklatur für GITR wurde hier bevorzugt verwendet, um diese mit der bereits bestehenden Publikation identisch zu halten; hier soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass die aktuelle

Bezeichnung von GITR TNFRSF18 lautet, der Ligand von GITR entsprechend TNFSF18.

Die Vermittlung eines ausgewogenen Gleichgewichtes zwischen TH1- und TH2-Reaktionen durch die Tregs spielt bei allergischen und asthmatischen Erkrankungen eine vorrangige Rolle. Kliniker der LMU-München und Universitätsklinik Freiburg konnten in Zusammenarbeit mit Kooperationsgruppen „Immunmonitoring“ und „Immunregulation im Kindesalter“ nachweisen, dass in den Atemwegen asthmatisch erkrankter Kinder die Anzahl regulatorischer T-Zellen herabgesetzt ist (Hartl et al 2007). Die zusätzliche Erkenntnis, dass inhalative Kortikoide, die zur symptomatischen Therapie von Asthma bronchiale eingesetzt werden, zu einer Erhöhung der Treg-Zahl führt, gibt weitere Hinweise auf die zentrale Stellung dieser Subpopulation in der Genese allergischer Krankheiten.

Im Rahmen dieser Zusammenhänge wurde für die hier präsentierte Dissertation folgende Fragestellung formuliert: *Beeinflusst mütterliche Atopie die Funktion regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut?*

## **2 Probanden und Methoden**

### **2.1 Probanden**

Im Rahmen der Kohortenstudie PAULINA (Pediatric Alliance Eor Unselected Longitudinal Investigation of Neonates for Allergies) wurde Nabelschnurblut (n=161) in der Universitäts-Frauenklinik in der Maistrasse in München rekrutiert.

Dabei handelte es sich um eine prospektive, nicht-selektive Langzeit-Kohortenstudie mit Probanden aus der Stadt München und Umgebung. Diese Studie wurde durch die bayerische Ethik-Kommission der bayerischen Landesärztekammer genehmigt und durch die LMU München gefördert.

Streng definierte Ein- und Ausschlusskriterien sowie die Beurteilung der Neugeborenen-Parameter mit Hilfe des APGAR-Score (Hautkolorit, Puls, Muskeltonus, Atemfrequenz, Reflexniveau) und Messung des pH der Nabelschnurarterie sowie der systemischen Infektionszeichen (CRP, erhöhtes IL6) bestimmten neben einer termingerechten komplikationsfreien Geburt die Auswahl der Probanden. Die Ausschlusskriterien beinhalteten dabei auch mütterliche Infektionen in den letzten 3 Schwangerschaftsmonaten, Fieber  $> 38,5^{\circ}\text{C}$  um bzw. zum Zeitpunkt der Entbindung, Autoimmunkrankheiten und rheumatologische Krankheitsbilder der Mütter sowie die regelmäßige Einnahme von Medikamenten während der gesamten Schwangerschaft. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Neugeborene mit pathologischem Kardiotokogramm, Asphyxie und Amnioninfektionssyndrom.

In die Studie aufgenommen wurden demnach Nabelschnurblutproben, die von vitalen, nicht gefährdeten Neugeborenen gesunder Mütter mit einer termingerechten und komplikationsfreien Geburt stammten.

### **2.2 Fragebögen und Einverständniserklärung**

Die Daten zu den einzelnen Studienteilnehmern und die Einverständniserklärung der Mütter/Eltern wurde in der Geburtshilfe vor der Entbindung mit Hilfe von Fragebögen und einer Einwilligung durch Unterschrift eingeholt (siehe Anhang).

Im Rahmen der Studie wurden nach ärztlicher Aufklärung über den Studienhintergrund mit Hilfe der Fragebögen Informationen zu Nikotinabusus, Geschlecht des Neugeborenen, Gestationsdaten wie Schwangerschaftsdauer, Geburtsparameter (Gewicht, Länge

und Kopfumfang des Neugeborenen), ethnische Zugehörigkeit (Europäer/Nicht-Europäer), Entbindungsmodus, Geschwister, Z.n. Abort, Z.n. Sectio caesarea und väterliche atopische Erkrankung erfragt und die Einverständniserklärung für die postpartale Blutentnahme aus der Nabelschnurvene eingeholt.

Bei Entgegennahme der Blutproben durch unsere Arbeitsgruppe wurde nochmals Kontakt mit den Müttern aufgenommen, um Details des Fragebogens und Fragen zur Studie zu beantworten.

## 2.3 Methoden

Mononukleäre Zellen (CBMCs) aus dem Nabelschnurblut wurden nach Separation mit Ficoll mit Lipid A (LpA), Peptidoglykan, Dermatophagoides pteronyssinus (D; Hausstaubmilbe), einer Kombination von D und LpA (D+L) und mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) und Ovalbumin (OVA) stimuliert. Die Lymphozytenproliferation wurde mit Hilfe von inkorporierten <sup>3</sup>H–Thymidin quantitativ gemessen. Die mRNA-Expression T-Zell-assoziiierter Gene, wie FoxP3, GITR, LAG3, CTLA4 und TGFβ wurde anhand der *Real Time RT-PCR* erfasst, die Zytokinkonzentrationen im Serum bzw. in Überständen (nach Zentrifugation) wurden mit Luminex gemessen. Die Ergebnisse stimulierter Zellen wurden mit den nicht-stimulierten verglichen.

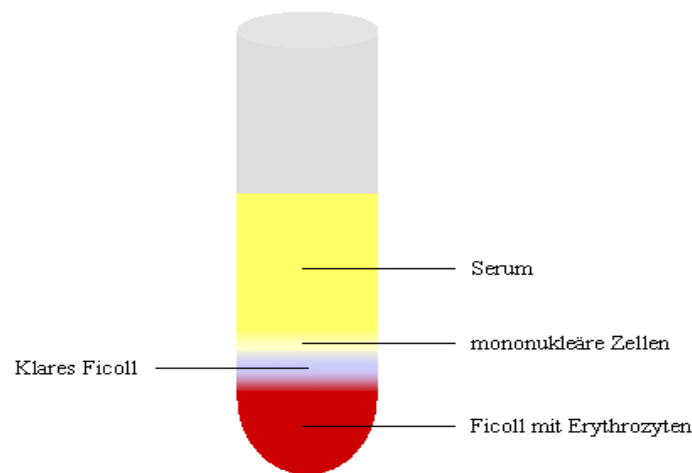
### 2.3.1 Entnahme von Nabelschnurblut/EDTA-Blut

Nabelschnurblut (3-4x10ml, mit Antikoagulanzen Liquemin) wurde aus der Nabelvene von gesunden, termingerecht entbundenen Neugeborenen entnommen. Von der Mutter wurde weiteres Untersuchungsmaterial aus einer peripheren Vene entnommen (4,9ml Serum und 1ml EDTA-Blut).

### 2.3.2 Zellkultur und Lymphozytenproliferation

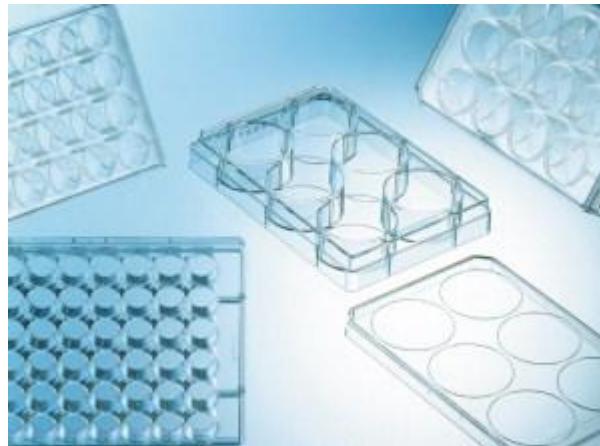
Das bei Raumtemperatur gelagerte Nabelschnurblut wurde innerhalb von 24 Stunden wie folgt verarbeitet, um eine zuverlässige Aussage für immunologische Parameter zu gewährleisten. Nach Messung des Gesamtblutvolumens und der Verdünnung mit gepuffertem NaCl (phosphate buffered saline PBS, Gibco, Invitrogen, Deutschland) im Verhältnis Blutvolumen zu PBS = 2 zu 1 wurden mit Ficoll-Hypaque Plus (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden), einem Separationsmedium, mononukleäre Zellen von Erythrozyten getrennt (Abbildung 4).

Abbildung 4: Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Ficollgradienten



Nach Abpipettieren der weißen, oben liegenden Zellreihe (mononukleäre Zellen) wurden diese Zellen in einem Nährmedium (RPMI 1640) gewaschen, zentrifugiert und erneut mit RPMI versetzt. 50  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden entnommen und mit 50  $\mu\text{l}$  Trypitanblaulösung und 50  $\mu\text{l}$  lysierender Pufferlösung versetzt. Damit erfolgte die Diskriminierung vitaler Zellen von abgestorbenen Zellen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer an einem Mikroskop in hundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast bestimmt. Die in der RPMI-Suspension vorliegenden Zellen wurden wie oben beschrieben nochmals zentrifugiert und das Zellpellet mit 10%igem Humanserum (Sigma Aldrich, Deutschland) verdünnt, sodass eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml vorlag. Anschließend wurde eine 96-Lochplatte zur Erfassung der Lymphozytenproliferation und eine 6-Lochplatte zur RNA- und Überstandgewinnung angelegt (Abbildung 5). Bei beiden Ansätzen wurden die mit Humanserum versetzten Lymphozyten [ $5 \times 10^6$  Zellen/ml] mit den Antigenen 3  $\mu\text{l}$  Lipid A ([LpA 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ]), Salmonella Minnesota Re-595), 3  $\mu\text{l}$  Peptidoglycan ([Ppg10  $\mu\text{g/ml}$ ], Staphylococcus aureus), 18  $\mu\text{l}$  Dermatophagoides pteronyssinus ([D 30  $\mu\text{g/ml}$ ], Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA), einer Kombination von 18  $\mu\text{l}$  D und 3  $\mu\text{l}$  LpA, mit 3  $\mu\text{l}$  des Mitogen Phytohämagglutinin [PHA 5  $\mu\text{g/ml}$ ] und 3  $\mu\text{l}$  Ovalbumin OVA als Negativkontrolle stimuliert. In der Zellkultur wurden nicht stimulierte Zellen unmittelbar nach Zugabe des Humanserums weiterbearbeitet. Die Vorgehensweise entspricht jener, die im folgenden Absatz beschrieben wird; eine Zellernte war deshalb bei nicht stimuliertem Medium nicht notwendig, da diese Zellen nicht inkubiert wurden.

Abbildung 5: Zellkultur in 6-well-Platte (Bildmitte) und Proliferationsplatte (links unten)



Quelle: Carl Roth GmbH + Co. KG 2010, Zellkultur Multiwell Platten.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% wurden die Zellen der stimulierten Medien der Zellkultur manuell geerntet und zentrifugiert, der Überstand wurde aus jedem Medium (PHA, LpA, Ppg, D, D+L) für Zytokinmessungen abpipettiert, das Zellpellet in 4 ml PBS aufgelöst, nochmals zentrifugiert und dann mit 1ml Trizol (Tri-Reagent) homogenisiert und bei -80°C gelagert.

Die Proliferationsreihe (M, PHA, OVA, LpA, Ppg, D, D & LpA) wurde nach 3 Tagen Inkubation mit 25 µl <sup>3</sup>H–Thymidin markiert und nach weiteren 8 Stunden Inkubation mit Hilfe eines Saug-Spülsystem (ComBI cell-harvester, Skatron Instrument, Deutschland) auf Filterpapier aufgetragen; die Lymphozytenproliferation (LP) wurde durch *counts per minute (cpm)* im  $\beta$ -Counter erfasst und anhand des Stimulationsindex (SI) quantitativ beurteilt. Der SI wurde durch Division der Mittelwerte stimulierter Medien durch nicht stimulierte Medien gebildet.

### 2.3.3 Genexpression

#### 2.3.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte nach Asservation der mit Tri-Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzten Zellen. Es wurden 0,2 ml Cholorform hinzugefügt und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C mit einer Umdrehungszahl von 1200/min. 15 Minuten zentrifugiert. In der darauf folgenden RNA-Präzipitation wurde nach Abpipettieren der wässrigen Phase 0,5 ml 100%iges Isopropanol und 1 µl Glycogen zugesetzt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert; dann erfolgte die Zugabe von 75%igem Ethanol, der sich eine weitere fünfminütige Zentrifugation angeschlossen hat. Auf einem Wärme-

block wurden die Proben bei 42°C 10 bis 30 Minuten getrocknet. Nach Resuspendieren mit RNase-freiem Wasser erfolgte eine Inkubation bei 60°C. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

### 2.3.3.2 cDNA-Präparation

Mit einem Photometer wurde die isolierte RNA-Menge gemessen. cDNA wurde aus 1µg RNA transformiert. Aus einem Mastermix A (1µl Oligo [500µg/ml] + 1 µl dNTP) wurden je 2µl zu der RNA (1µg) gegeben. In einem *PCR-Cycler* wurde das Produkt für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. 7 µl aus Mastermix B (4 µl Puffer + 2µl DTT + 1µl RNAaseOUT) wurden vor dem Durchlauf eines weiteren Cyclerprogramms bei einer Temperatur von 42°C und einer Dauer von 2 Minuten hinzugegeben; schließlich folgte die Zugabe von 1µl Superscript. Erneuter Durchlauf für 50 Minuten bei einer Temperatur von 42°C im *Cycler*. Ein Mikrogramm RNA lag in Form von 20 µl cDNA verdünnt vor – somit lag eine Konzentration von 50ng/µl cDNA vor. Anschließend wurde die cDNA bei -80°C gelagert. Diese cDNA konnte zur Amplifikation im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet werden.

### 2.3.3.3 Quantitative Real Time RT-PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für das Experiment der Polymerase-Ketten-Reaktion RNA von einer Teilmenge von 54 Probanden aus insgesamt im Rahmen der Studie „PAULINA“ verwertbaren 118 Nabelschnurblutproben herangezogen. Die aus mRNA transkribierte cDNA wurde im Rahmen der *Real-Time RT-PCR* auf die Expression T-Zell-assoziiierter Gene untersucht. Aufgrund nicht verwertbarer PCR-Daten (n=2), einer Neugeborenenensepsis (n=1) und fehlender Einwilligung einer Mutter (n=1) wurden insgesamt 4 von 54 Proben im PCR-Experiment ausgeschlossen. Die PCR-Daten setzen sich somit aus 26 Kindern nicht-atopischer Mütter und 24 Kindern atopischer Mütter (n=50) zusammen.

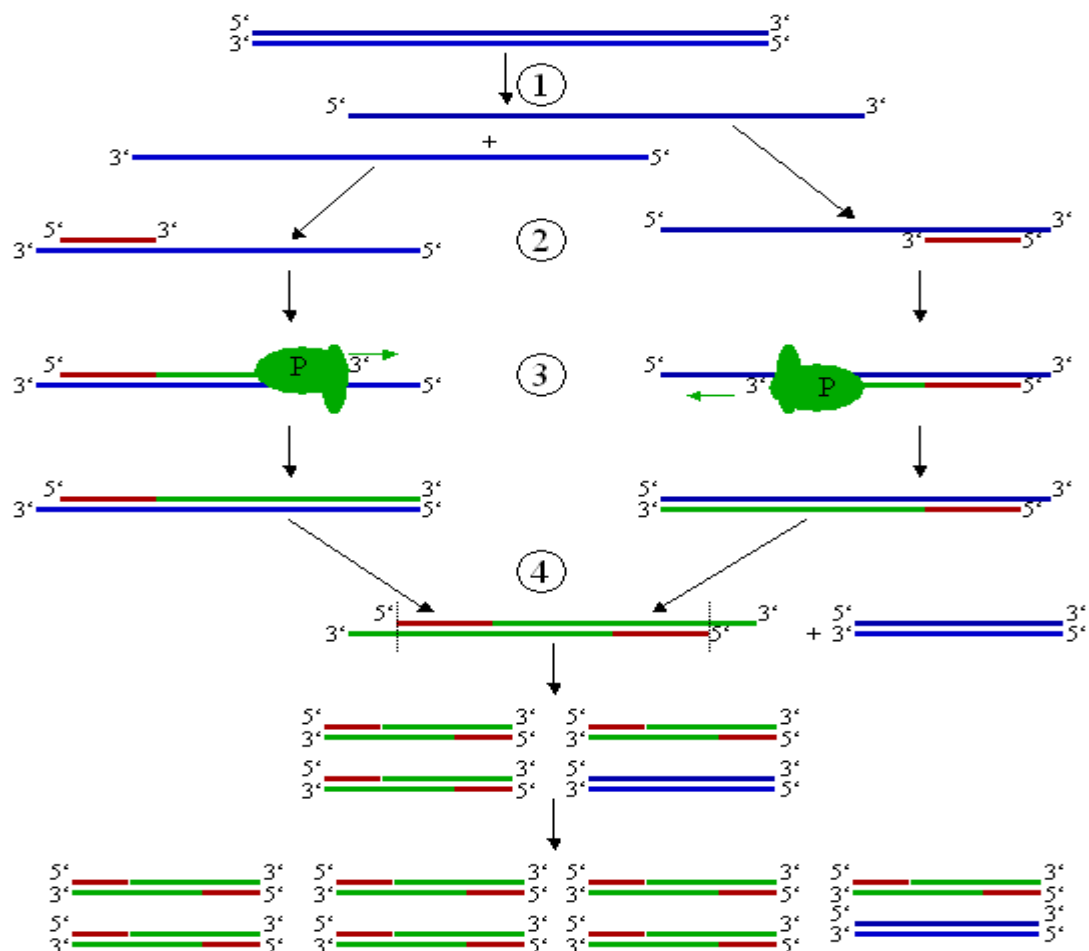
#### 2.3.3.3.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine molekulargenetische Methode zur selektiven Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Doppelhelix-Sequenz. Bezeichnet wird dieser Vorgang auch als Amplifikation. Die Bezeichnung „*Real Time*“ beschreibt eine PCR, bei der die Quantifizierung der Amplikons auch noch nach 25-30 Zyklen aufgezeichnet werden kann. Mit Hilfe optischer Systeme kann Online (Bio-Rad, München Deutschland) die Quantität der amplifizierten Matrizen abgelesen werden. Als Detektionshilfsmittel werden dafür fluoreszierende Moleküle, sog. Fluorophore eingesetzt, die an se-

quenzspezifische Oligonukleotide endständig gekoppelt sind. Für die PCR dieser Arbeit wurde das Fluorophor SYBR-Green (Applied Biosystems) verwendet.

Innerhalb des Prozesses der PCR werden zunächst die Schritte der Initialisierung und der Denaturierung bei Temperaturen von 90-96°C zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge und zur Enzymaktivierung durchlaufen. Anschließend lagern sich die Primer (spezifische Oligonukleotide) bei an dem zu amplifizierenden Bereich der Einzelstränge an und dieser Schritt des Annealings bedarf konstanter und korrekt gewählter Temperaturen (55-65°C), da es sonst zu unspezifischen PCR-Produkten kommen kann. Die Oligonukleotide werden in der Elongation bei einer Temperatur von 68-72°C durch die thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase durch freie Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert, bis die Polymerase abfällt oder der Vorgang durch einen neuen Denaturierungsschritt unterbrochen wird (siehe Abbildung 6):

Abbildung 6: Schema der PCR Schritte mit Initialisierung und Denaturierung (1&2) und Annealing & Elongation (3&4); P = Polymerase



Quelle: Schwaab (ohne Jahresangabe).



Der exponentielle Verlauf der Amplifikationskurve kann anhand folgender Formel mathematisch erklärt werden:

$$N_n = N_0 \times 2^n$$

$N_n$  = cDNA-Menge nach dem n-ten Zyklus.

$N_0$  = cDNA-Menge zu Beginn der PCR (vor der Amplifikation)

n = Anzahl der Zyklen

Durch die Spaltung des DNA-Doppelstranges dienen zu Beginn der DNA-Vervielfältigung immer zwei Einzelstränge jeweils als Matrize ( $2^n$ ); die aus dem ersten Zyklus hervor gehenden 4 Einzelstränge werden im nächsten Zyklus ebenfalls als Vorlage verwendet und ergeben 8 Einzelstränge (Abbildung 6).

$$N_1 = N_0 \times 2^1 = 2N_0 \quad N_2 = N_0 \times 2^2 = 4N_0 \quad N_3 = N_0 \times 2^3 = 8N_0$$

#### 2.3.3.3.2 Primerdesign

Die Primer wurden auf mRNA-Ebene mit Vector NTI-Advance10 designed. Die Primerpaare (forward & reverse) wurden spezifisch für die zu untersuchenden Gene Foxp3, GTR, LAG3, CTLA4 und TGF $\beta$  synthetisch hergestellt. Als Kontrollgene wurden 18SrRNA und Mikroglobulin 2 eingesetzt. Charakterisiert sind diese Kontrollgene durch ihr konstantes PCR-Verhalten, d.h. auch bei unterschiedlichen Bedingungen wie beispielsweise stimuliert vs. nicht stimuliert, weisen sie eine geringe Schwankungsbreite auf. In einem Pilotprojekt für Nabelschnurblut wurden diese getestet und haben sich als die stabilsten „housekeeping genes“ erwiesen. Die Primersubstanzen [1mM] wurden vor Einsatz in der PCR zweimal verdünnt: 10 $\mu$ l eines Primers [1mM] wurden mit 90  $\mu$ l RNase freiem Wasser versetzt; die 0,1mM Verdünnung wurde wie die Ausgangssubstanzen ebenfalls bei -20°C gelagert; für die PCR wurde eine weitere Verdünnung [1  $\mu$ M] verwendet; dafür wurden jeweils 5  $\mu$ l des 0,1 mM „forward primer“ und 5  $\mu$ l des 0,1 mM „reverse primer“ in 490  $\mu$ l destilliertem Wasser gemischt. Das Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l [1 $\mu$ M] stellte die in der PCR verwendete Primerlösung mit einem Primerpaar dar. Diese Suspension wurde bei 4°C aufbewahrt.

#### 2.3.3.3.3 Berechnung für 30 $\mu$ l Endvolumen pro Ansatz

Die PCR-Platte wurde mit einem cDNA-Mix, einem Mastermix A und einem weiteren Mastermix B für die *non-template-control-Reihe* (NTC) bestückt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Primer [1 $\mu$ M]. Folgende Arbeitsschritte wurden in einem prä-PCR-Raum durchgeführt:

Formel für cDNA-Mix:

$(\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times 3,6 \mu\text{l cDNA-Mix} = \text{Gesamtvolumen } V_g(\mu\text{l})$

$V_g(\mu\text{l}) : 15 = \text{cDNA}(\mu\text{l})$ . Das Verdünnungsverhältnis entspricht somit 1:15.

$V_g(\mu\text{l}) - \text{cDNA}(\mu\text{l}) = \text{DEPC-Wasser}(\mu\text{l})$ . Wasser wurde in sterile Röhrchen vorgelegt, die cDNA dazu pipettiert.

Formel für Mastermix A:

$(\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times 6,3 \mu\text{l DEPC} + (\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times 12,6 \mu\text{l SYBR-Green} = V_{\text{DEPC}}(\mu\text{l}) + V_{\text{SYBR}}(\mu\text{l})$ .

Formel für Mastermix B:

$(\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times 9,9 \mu\text{l DEPC} + (\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times 12,6 \mu\text{l SYBR-Green} = V_{\text{DEPC}}[\mu\text{l}] + V_{\text{SYBR}}[\mu\text{l}]$ .

Mit Hilfe der NTC (Negativkontrollen) wird der Ausschluss von Kontamination mit Fremd-DNA und unspezifischer Primer-DNA (Primer-dimer) dokumentiert.

#### 2.3.3.3.4 Pipettierschema für PCR-Ansatz

Pro Ansatz werden 18,9  $\mu\text{l}$  aus Mastermix A (ausgenommen NTC) gefolgt von 3,6  $\mu\text{l}$  aus dem cDNA-Mix pipettiert; die NTC erhielten jeweils 22,5  $\mu\text{l}$  aus Mastermix B; zuletzt erfolgte der Zusatz von 7,5  $\mu\text{l}$  Primer [1  $\mu\text{M}$ ]. Für die RT-PCR wurden die Primer für die Gene FoxP3, GITR, CTLA4, LAG3 und TGF $\beta$  und die Kontrollgene 18S und  $\beta$ 2mik eingesetzt. Luftblasen in den Reaktionsansätzen wurden nach Abkleben der PCR-Platte mit einer Klebefolie (Bio-Rad) durch Zentrifugieren (3 min.) bei max. 20 °C und einer Umdrehung von 850 (rcf) eliminiert. Die Abbildung 7 zeigt schematisch das Pipettieraster der in Abbildung 8 dargestellten PCR-Platte; die farbigen Pfeile repräsentieren ein und denselben *Primer* pro Spalte.

Abbildung 7: Pipettiervorlage für PCR-Platte mit Darstellung der Primer (Position A1-7) und nicht-stimuliertem (M) sowie stimuliertem Ansatz (PHA, LpA, Ppg, D und D+L); NTC als Qualitätskontrolle der Primer.

PCR-Template:  
Sample: P28 M-D+L;/  
cDNA:118,119,120-123;/  
RT-PCR:

Position 2B  
mit 30 µl  
Ansatz

N

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	Mik	Foxp3/2	GITR	CTLA4	LAG3/1	TGFβ/2	18S	Mik	Fox	GITR	CTLA
M28								D				
B								18S	Mik	Fox	GITR	CTLA
M								D				
C								LAG	TGFβ	LAG	TGFβ	
PHA								D	D	D	D	
D								18S	Mik	Fox	GITR	CTLA
PHA								D+L				
E								18S	Mik	Fox	GITR	CTLA
LpA								D+L				
F								LAG	TGFβ	LAG	TGFβ	
LpA								D+L	D+L	D+L	D+L	
G								18S	Mik	Fox	GITR	CTLA
Ppg								NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
H								LAG	TGFβ			
Ppg								NTC	NTC			

Abbildung 8: PCR-Platte (96-well-Platte)



Quelle: GeneOn GmbH 2011, PCR-Platten, 96 well

### 2.3.3.3.5 *iCycler-Protokoll für die Real Time RT-PCR*

In einem *iCycler* wurden die einzelnen Schritte der PCR nach vorausgegangener Optimierung der vorliegenden *Primer* nach folgendem Protokoll durchlaufen:

<b>Zyklus 1: (1x)</b>	95,0°C	10 Minuten (= Initialisierung)
<b>Zyklus 2: (40x)</b>		
Schritt 1:	95,0°C	20 Sekunden (= Denaturierung)
Schritt 2:	62,5°C	1 Minute (=Annealing)
Schritt 3:	72,0°C	40 Sekunden (= Elongation)
<b>Zyklus 3: (1x)</b>	72,0°C	2 Minuten (=Elongation)
<b>Zyklus 4: (1x)</b>	95,0°C	30 Sekunden
<b>Zyklus 5: (1x)</b>	55,0°C	30 Sekunden
<b>Zyklus 6: (80x)</b>	55,0°C	10 Sekunden

Tabelle 1: PCR-Zyklen

### 2.3.3.3.6 *Gel-Elektrophorese*

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld. Das elektrophoretische Verfahren wird vor allem in der Protein- und Nukleinsäurenanalytik angewendet (Pingoud, 1997).

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates bei allen pH-Werten negativ geladen. Deshalb wandern die Nukleinsäuren durch die Poren des in Puffer eingelegten Agarosegels in der Elektrophorese zur Anode (Pluspol). Je nach Agarosekonzentration wird eine Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge bis 50 Basenpaare (bp) ermöglicht. Kurze Moleküle wandern dabei weiter als lange Moleküle, da sie weniger Widerstand durch die Gelporen erfahren. Eine höhere Konzentration des Gels bedeutet eine bessere Auflösung der Moleküle bzw. des Bandenbildes, da die Konzentration die Porengröße bestimmt (Müller, 2001).

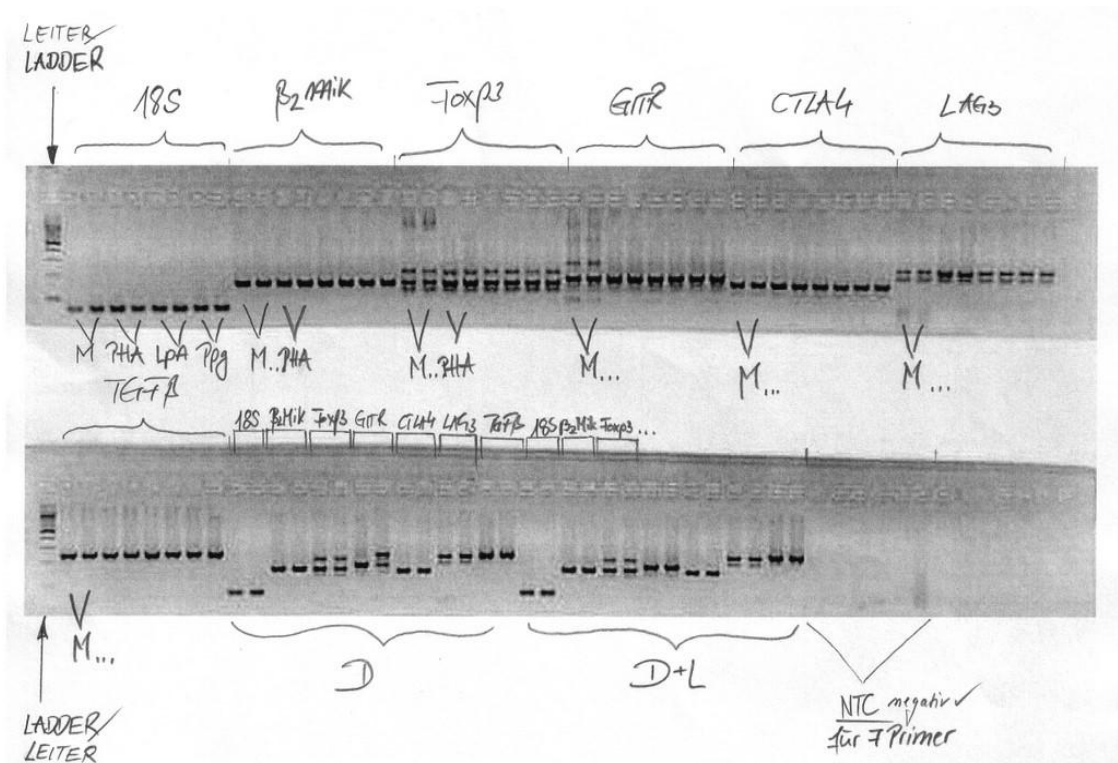
Für das Agarosegel [3%] wurden 6 g Agarosepulver in einem hitzebeständigen Glaskolben mit 200 ml 0,5fach- Puffer ([900 ml Aqua bidest + 100 ml 5xTBE]) aufgegossen und mindestens 4 Minuten in einer Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt.

In einer Gelkammer wurden mit vier Kämme Taschen formiert. Das Gel wurde mit 70 µl Ethidiumbromid in die Kammer gegossen, die Kämme nach 30 Minuten Abkühlen entfernt und der Gelstreifen bis zur Durchführung der Elektrophorese bei 4 °C aufbe-

wahrt. Ethidiumbromid ist eine interkalierende sequenzspezifische DNA-bindende Substanz, die eine Anfärbung und das Sichtbarmachen von Nukleinsäuren unter UV-Licht ermöglicht. Die PCR-Produkte und die NTC wurden nach beendeter PCR anhand einer Multipipette mit 4 µl „loading dye“ pro Ansatz versetzt; für die Elektrophorese wurden 18 µl pro Geltasche eingesetzt. Das Gewicht des Glycerinanteils im „loading dye“ hält die DNA in den einzelnen Geltaschen. Bei einer Spannung von 120 V, 400 mA und einer Laufzeit von 30 bis 45 Minuten wurde die Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend der Gelstreifen mit dem Bandenbild unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 403 nm mit einer Kamera fotografiert (Abbildung 9).

Zur Beurteilung der Größe der amplifizierten Gene (PCR Produkte) wurde am Anfang und am Ende der Taschenreihe des Gelstreifens eine Standardsubstanz (10µl) in Form einer Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe (bis zu 100 bp) enthält, platziert. Die Anzahl der Basenpaare der in der PCR amplifizierten Genprodukte konnte dadurch mit den bereits bekannten Sequenzgrößen der Primer (zu amplifizierende Gene) verglichen werden und damit auf eine spezifische Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes geprüft werden.

Abbildung 9: Bandendarstellung in der Gelelektrophorese (Fotoscan): Gene 18S,  $\beta$ 2-Mik, FoxP3, GITR, CTLA4, LAG3 und TGF $\beta$  unter Stimulationsbedingung mit PHA, LpA, Ppg, D, D & L [LpA] und ohne Stimulation (M); NTC zur Qualitätskontrolle.



#### 2.3.3.4 Datenanalyse der Real Time RT-PCR

Im Folgenden werden Definitionen grundlegender Begriffe zur Amplifikation und deren Kurvenverlauf erläutert:

In Abbildung 10 wird die Quantifizierung der Amplifikation von cDNA graphisch dargestellt; dabei ist die Anzahl der PCR-Zyklen auf der *x*-Achse gegen die Intensität des Fluoreszenzsignals auf der *y*-Achse aufgetragen.

Der *Threshold* (orange Linie, *y*-Achsenwert 250) ist ein Schwellenwert, der durch das *Cycler-Programm* automatisch gesetzt wurde, kann jedoch auch manuell gewählt werden. Die *Threshold-Linie* wird so platziert, dass sie sich in der sogenannten exponentiellen Phase der Amplifikationskurve befindet.

Der Schnittpunkt zwischen diesem Schwellenwert und der Amplifikationskurve markiert den *Threshold cycle* ( $C_T$ ). Der  $C_T$ -Wert definiert somit die Anzahl der Zyklen, die bis zum markanten Anstieg der Amplifikation und dem damit einhergehenden signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals durchlaufen worden sind.

Abbildung 10: PCR-Amplifikationsgraphen eines Kontrollgens (Zyklus 22-23, 2 Duplikate) und des Primers TGF $\beta$  (Zyklus 27, 1 Duplikat)

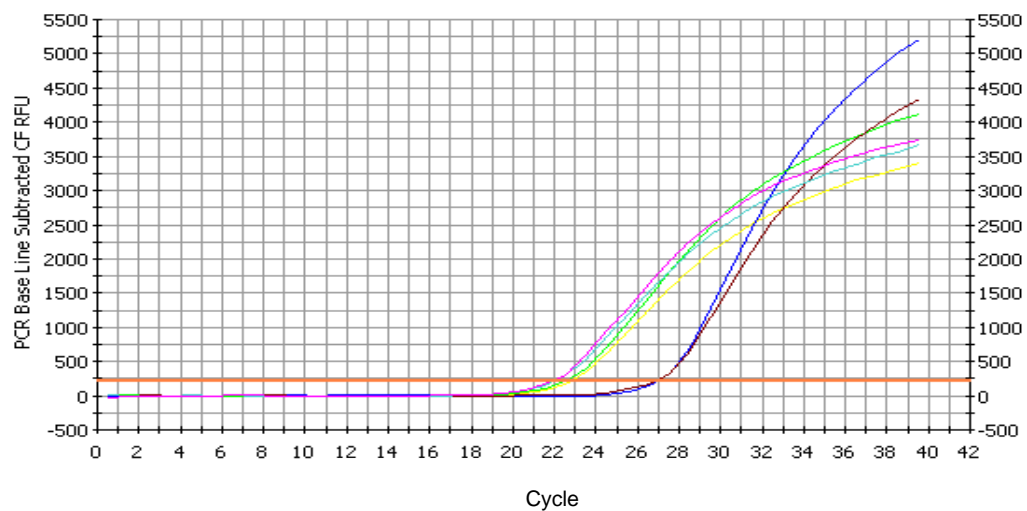
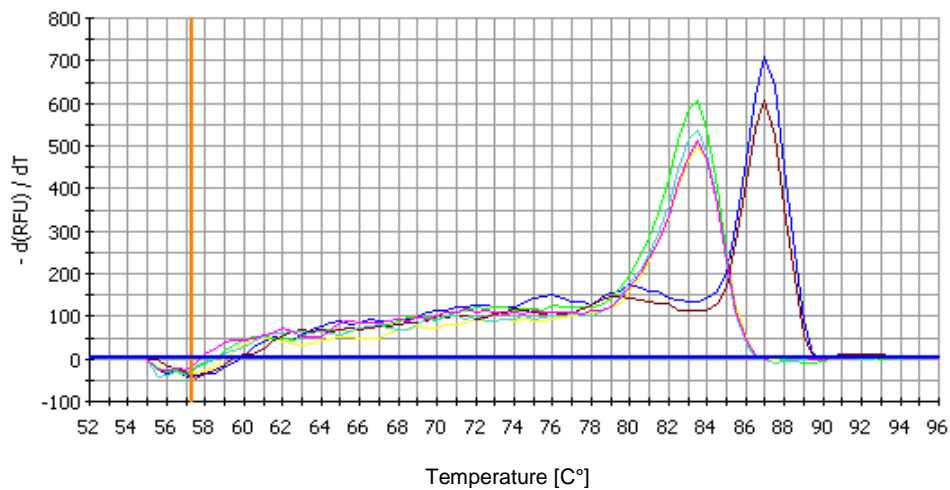


Abbildung 11: PCR-Schmelzkurve eines Kontrollgens (83-84°C, 2 Duplikate) und des Primers TGFβ (87°C, 1 Duplikat)



Der  $C_T$ -Wert (Anzahl der abgelaufenen Zyklen bis Amplifikationsbeginn) sollte sich jeweils für Replikate und deren zugehöriges Amplifikationsprodukt ungefähr im selben Zyklus befinden. In der Abbildung 10 zeigt sich diese optimale Anordnung der Zyklen besonders gut; es liegen Quantifikationskurven von zwei verschiedenen Primern vor, im Zyklus 22-23 liegt der  $C_T$  des Kontrollgens, im Zyklus 27 ordnet sich dagegen der Primer TGFβ ein. Die Duplikate, beim Kontrollgen zwei und bei TGFβ ein Duplikat, liegen dabei exakt im selben Bereich und beweisen damit bereits in der Quantifikationsdarstellung eine gute Qualität der Amplifikation. Die Qualität der PCR wird jedoch besonders durch den Verlauf der Schmelzkurven bestimmt (Abbildung 11).

Die maximale Temperatur der Schmelzkurve beschreibt dabei jene Temperatur, bei der sich die Primer an die komplementären cDNA-Abschnitte der dissoziierten Einzelstränge anlagern und die Amplifikation starten. Sämtliche Experimente im Rahmen der PCR wurden in Duplikaten und bei exakt gleichen Temperaturen durchgeführt, um bei der Auswertung der Daten die Schmelzkurven der Amplifikation innerhalb einer cDNA-Probe und ihrem jeweiligen Stimulus vergleichen zu können und damit die Qualität des Amplifikationsproduktes und die Funktion der Primer besser beurteilen zu können. Aus den  $C_T$ -Werten der Duplikate wurde ein Mittelwert berechnet. Mit Hilfe der kontinuierlichen Prüfung der Schmelzkurve parallel zum Verlauf des quantitativen Amplifikationsgraphen konnten sogenannte Primer-Dimer-Formationen erkannt werden; sie werden meist durch eine niedrigere Schmelztemperatur auffällig und zeigen eine nicht spezifische Amplifikation an. In Abbildung 11 sind die Schmelzkurven der in Duplikaten pipettierten Gene, die bereits in den vorangegangenen Amplifikationsgraphen dargestellt wurden beschrieben, der erste Temperaturgipfel beschreibt die Schmelzkurven von zwei Duplikaten des Kontrollgens, das zweite Temperaturmaximum beschreibt ein

Duplikat von TGFβ. Wie bereits im Abschnitt Agarosegel beschrieben, diente die Gelelektrophorese ebenfalls der Beurteilung der Qualität (Spezifität) des Amplifikationsproduktes durch die Einordnung der erwarteten Größe des Genproduktes anhand einer Basenpaarleiter (*ladder*). Nach Auswahl der verwertbaren  $C_T$ -Werte für die jeweiligen Genprodukte (18S/β2Mik, FoxP3, GITR, CTLA4, LAG 3 und TGFβ) wurde nach Mittelwertberechnung der Duplikatergebnisse für den jeweiligen Stimulus die Differenz (deltaCT) zwischen Gen und Referenzgen (18S) errechnet. Es wurde das *housekeeping gene* 18S aufgrund seiner Stabilität als Referenzgen für die Berechnungen verwendet.

Beispiel:

$CT\ FoxP3\ PHA(1) + CT\ FoxP3\ PHA(2)/2 = \text{Duplikat-Mittelwert MW „FoxP3 PHA“}$ .

Differenz zwischen Gen und Referenzgen:  $MW\ „FoxP3\ CT\ PHA“ - MW\ „FoxP3\ CT\ 18S“ = \text{delta CT}$ . Anschließend wurde innerhalb einer Gengruppe  $\text{deltadeltaCT}$  gebildet zwischen den jeweiligen stimulierten Proben und den nicht stimulierten Proben (Media).

Beispiel:  $FoxP3PHA - FoxP3Media = \text{deltadeltaCT FoxP3}$

Der *fold difference* (*Vielfaches*) wurde dann anhand der Formel  $2^{-(\text{deltadeltaCT})}$  berechnet (Formel aus Bio-Rad-Manual).



## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Die PAULINA-Studie**

Die PAULINA-Studie (Paediatric Alliance for Unselected Longitudinal Investigation of Neonates for Allergies) ist eine prospektive longitudinale Geburts-Kohortenstudie, die immunologische und genetische Faktoren für die Entstehung von Allergien und Asthma bronchiale im Kindesalter im Zusammenhang mit dem Vorliegen von mütterlicher/väterlicher Atopie untersuchte. Die Studienteilnehmer aus München und Umgebung wurden in zwei Untergruppen unterteilt; dabei wurden mononukleäre Zellen (CBMCs) aus dem Nabelschnurblut atopischer (A) und nicht-atopischer (NA) Mütter untersucht.

Die Definition „Atopie“ wurde durch die ärztlich gestellte Diagnose allergische Rhinitis (Heuschnupfen) und/oder Asthma bronchiale und/oder atopisches Ekzem (Dermatitis) festgelegt.

Das Ziel der Studie bestand darin, festzustellen, ob die Exposition gegenüber allergenen und mikrobiellen Substanzen in den beiden Untergruppen CBMCs (A) und CBMCs (NA) unterschiedliche Immunreaktionen verursacht.

In weiteren Arbeiten wurde durch die Arbeitsgruppe untersucht, ob dann auch im Langzeitverlauf bei den heranwachsenden Kindern, deren Nabelschnurblut in der PAULINA Studie untersucht worden ist, ein Einfluss auf die Entwicklung allergischer Krankheiten im Kindesalter abzuleiten ist; dazu werden in dieser Arbeit keine Daten präsentiert.

### **3.2 Studienteilnahme**

Von 161 rekrutierten Müttern konnten die in Fragebögen dokumentierten Daten und die CBMCs von insgesamt 118 Neugeborenen in der Studie ausgewertet werden. Strenge Ausschlusskriterien, wie Infektionszeichen und postpartale Komplikationen der Neugeborenen, sowie Medikamenteneinnahme/Erkrankungen der Mütter und ggf. fehlende Angaben in den Fragebögen waren konkret definiert. Somit erfolgte insgesamt ein Ausschluss von  $n = 43$ . Die 118 ausgewählten Studienteilnehmer erfüllten neben der Vollständigkeit der erfragten Daten (siehe Fragebögen im Anhang), der Einwilligung zur Studienteilnahme auch strenge Einschlusskriterien einer komplikationslosen

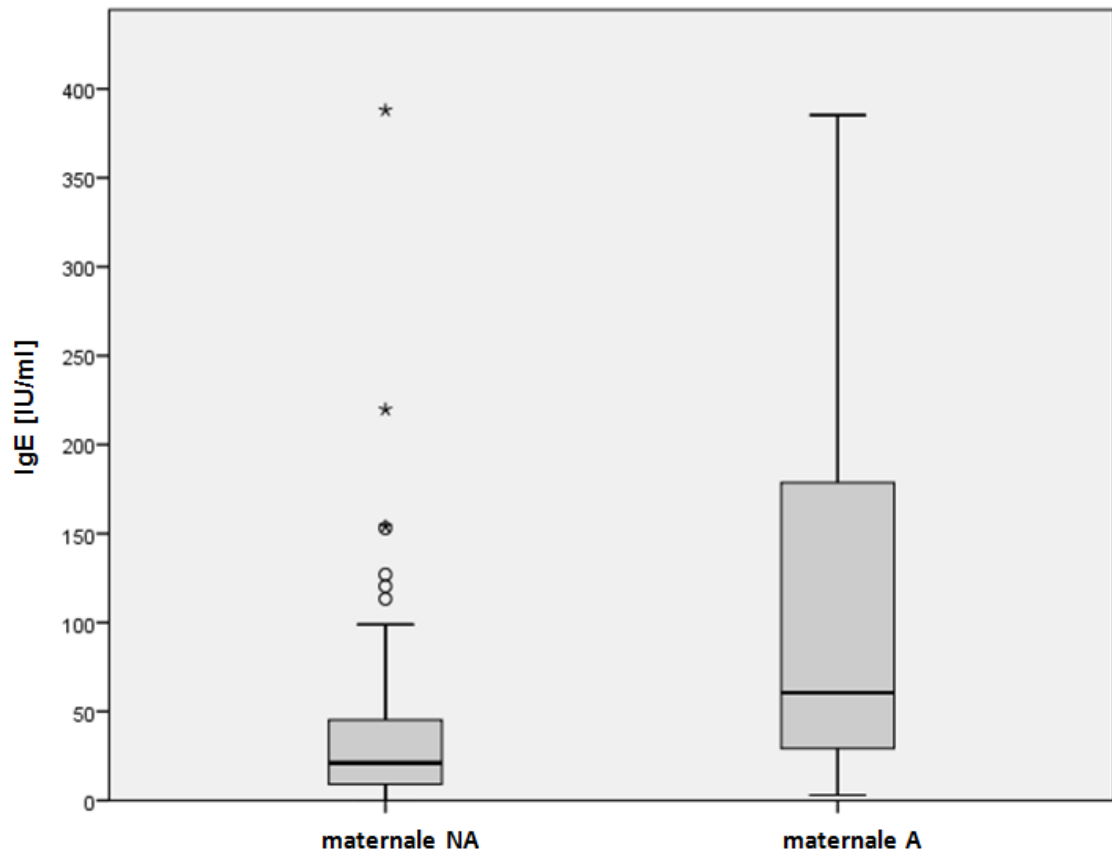
Schwangerschaft mit einer termingerechten, komplikationsfreien Geburt; die Neugeborenen waren nach der Erstuntersuchung und im weiteren Verlauf unauffällig und wiesen keine Infektionszeichen oder andere postpartale Probleme auf. Die Probanden setzen sich aus den Neugeborenen von 70 nicht-atopischen Müttern und 48 atopischen Müttern zusammen.

Das Schwerpunkt-Experiment der vorliegenden Arbeit ist die PCR, für die insgesamt 54 Probanden von 118 ausgewählt wurden; nach sorgfältiger Überprüfung aller notwendigen Daten (Fragebögen) konnten schließlich 50 von 54 PCR-Ergebnissen vollständig ausgewertet und im Ergebnisteil präsentiert werden.

### **3.3 Epidemiologische Charakteristika der Probanden**

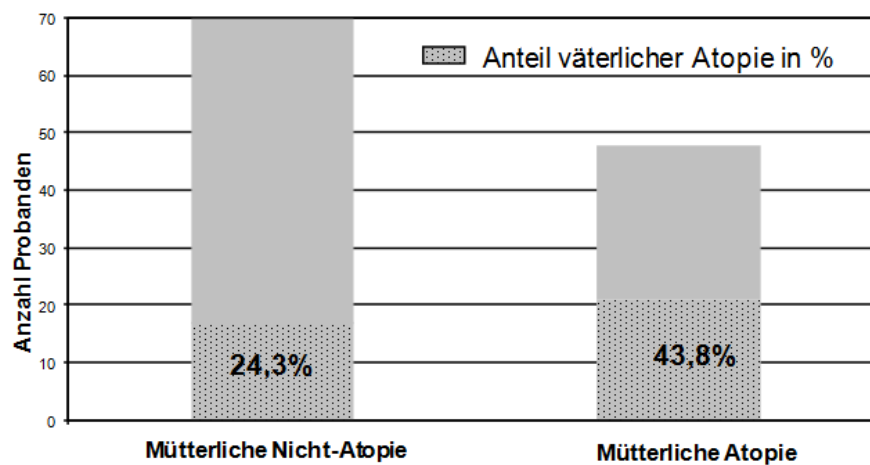
Die beiden Gruppen, atopische Mütter und nicht-atopische Mütter unterschieden sich signifikant voneinander in der Höhe des Gesamt-Immunglobulin IgE ( $p < 0,0001$ ). Bei den atopischen Müttern wurde ein Gesamt-IgE von 60,54 IU/ml, bei den nicht-atopischen Müttern 21,18 IU/ml im Serum gemessen (Abbildung 12).

Abbildung 12: Gesamt-Immunglobulin E [IU/ml] im Serum nicht-atopischer (NA, n = 70) und atopischer (A, n = 48) Mütter mit Darstellung des Medians, der 1. und 3. Quartile (Balken) & der 3./97. Perzentile; NA mit einzelnen Ausreißern



Wie Abbildung 13 zeigt, unterscheiden sich die beiden Gruppen auch im Vorliegen von väterlicher Atopie ( $p = 0,03$ ).

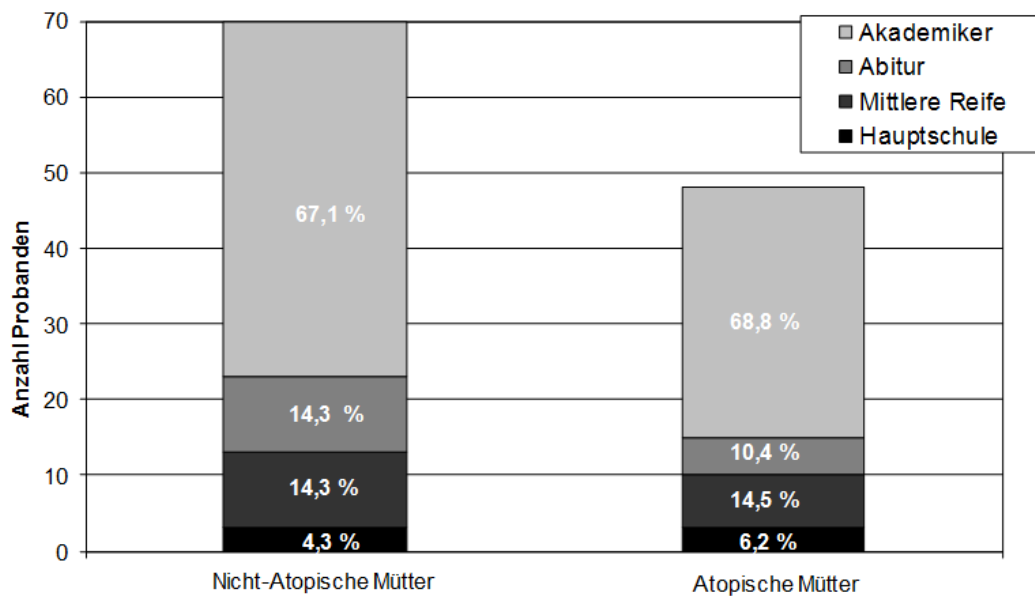
Abbildung 13: Anteil väterliche Atopie



Alle weiteren Angaben, die im Rahmen der Befragung gemacht wurden, speziell zur Raucher-Anamnese, dem Gestationsalter, dem Entbindungsmodus, der Abort- und Sectio-Anamnese ergaben keine signifikanten Unterschiede der beiden Probandengruppen.

Die Bildung und Schullaufbahn der schwangeren Mütter setzte sich wie in Abbildung dargestellt, folgendermaßen zusammen:

Abbildung 14: Bildungsgrad Mütter



Ein interessantes Ergebnis war die Feststellung, dass die Neugeborenen von atopischen Müttern grundsätzlich größere Geburtsparameter aufwiesen; dabei unterschieden sich Gewicht, Körpergröße und Kopfumfang signifikant von den Neugeborenen der Nicht-Atopiker ( $p < 0,02$ ) – (*Tabelle 2: Probanden-Charakteristika*).

Einen Gesamtüberblick zu den Probanden und den Daten der Fragebögen gibt die Darstellung in folgender Tabelle:

<b>Probanden &amp; Charakteristika</b>	<b>Nicht-atopische Mütter n= 70</b>	<b>Atopische Mütter n=48</b>	<b>P-Wert</b>
Mütterliches Alter (Jahre) *	33 (31/36)	32,5 (31/36)	0,81
Rauchen in Schwangerschaft n, (%)	4 (5,7)	3 (6,3)	0,79
<b>Spezifisches IgE i.S &gt; 0,7 IU/ml (%)</b>	43,5	85,4	<b>&lt;0,001</b>
<b>Gesamt IgE im Serum (IU/ml), Median</b>	21,18	60,54	<b>&lt;0,0001</b>
Gestationsalter (Wochen) *	40 (39,1/40,7)	39,9 (38,9/40,9)	0,99
Geschlecht Neugeborene, männlich n, (%)	34 (48,6)	28 (58,3)	0,30
<b>Geburtsgewicht (g) *</b>	3450 (3150/3700)	3695 (3485/3937)	<b>0,008</b>
<b>Körpergröße (cm) *</b>	52 (50/53)	53 (51/54)	<b>0,02</b>
<b>Kopfumfang (cm) *</b>	35 (35/36)	35,4 (35/36,75)	<b>0,02</b>
Entbindungsmodus, vaginal n, (%)	64 (91,4)	44 (91,7)	0,91
5 min. Apgar > 8 n, (%)	70 (100)	48 (100)	1,0
<b>Väterliche Atopie n, (%)</b>	17 (24,3)	21 (43,75)	<b>0,03</b>
- Asthma bronchiale	3 (4,3)	5 (10,4)	0,27#
- allergische Rhinokonjunktivitis	16 (22,9)	15 (31,3)	0,31
- Atopisches Ekzem	2 (2,9)	6 (12,5)	0,06#
Ältere Geschwister n (%)	26 (37,2)	20 (43,8)	0,35

\* Median (25./75. Perzentile); # Fisher's exact test oder Wilcoxon Test.

Tabelle 2: Probanden-Charakteristika

### 3.4 Proliferation von CBMCs atopischer (A) und nicht-atopischer (NA) Mütter

In der Proliferation zeigt sich bei Neugeborenen atopischer Mütter eine höhere Proliferationsrate (Zellteilung), jedoch konnte im Vergleich zwischen CBMCs (A) und CBMCs (NA) kein signifikanter Unterschied nach Stimulation der mononukleären Zellen festgestellt werden. Nach PHA-Stimulation sehen wir eine deutliche Stimulation mit einem Stimulationsindex (SI) von 14,6 bei den CBMCs nicht-atopischer Mütter und einem SI von 18,9 bei den CBMCs atopischer Mütter (A). Dem gegenüber ist bei den anderen Stimuli der Stimulationsindex um 1 gruppiert, somit fällt hier eine niedrige, aber messbare Stimulation auf.

In Tabelle 3, Stimulationsindizes der Proliferation bei CBMCs (NA) und (A), werden die Proliferationsergebnisse jener 50 Probanden dargestellt, deren mRNA für das PCR-Experiment dieser Arbeit verwendet wurde.

Stimulus	Stimulationsindex SI CBMCs (NA); n=26			Stimulationsindex SI CBMCs (A); n=24			Signifikanz p Mann-Whitney Rank Sum Test
	Median	25. Perz.	75. Perz.	Median	25. Perz.	75. Perz.	
PHA	14,6	9,23	32,8	18,9	12,64	31,9	0,16
OVA	1,02	0,93	1,17	1,06	0,96	1,19	0,75
LpA	0,96	0,76	1,27	1,13	0,99	1,69	0,18
Ppg	1,14	0,93	1,73	1,57	1,04	3,28	0,10
D	1,13	0,82	1,49	1,33	0,99	2,2	0,23
D+L	0,97	0,79	1,47	1,22	0,94	2,18	0,23

SI = Stimulationsindex (Stimulierte Zellen/Nicht stimulierte Zellen)

Tabelle 3: Stimulationsindizes der Proliferation bei CBMCs (NA) und (A)

PHA weist als Positivkontrolle einen im Vergleich zu den anderen Stimuli sehr hohen Stimulationsindex auf, da es sich bei diesem Mitogen um einen potenten T-Zell-Stimulus handelt (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

Abbildung 15: Stimulationsindex der CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer (A) Mütter nach Stimulation mit Phytohämagglutinin PHA (25. und 75. Perzentile)

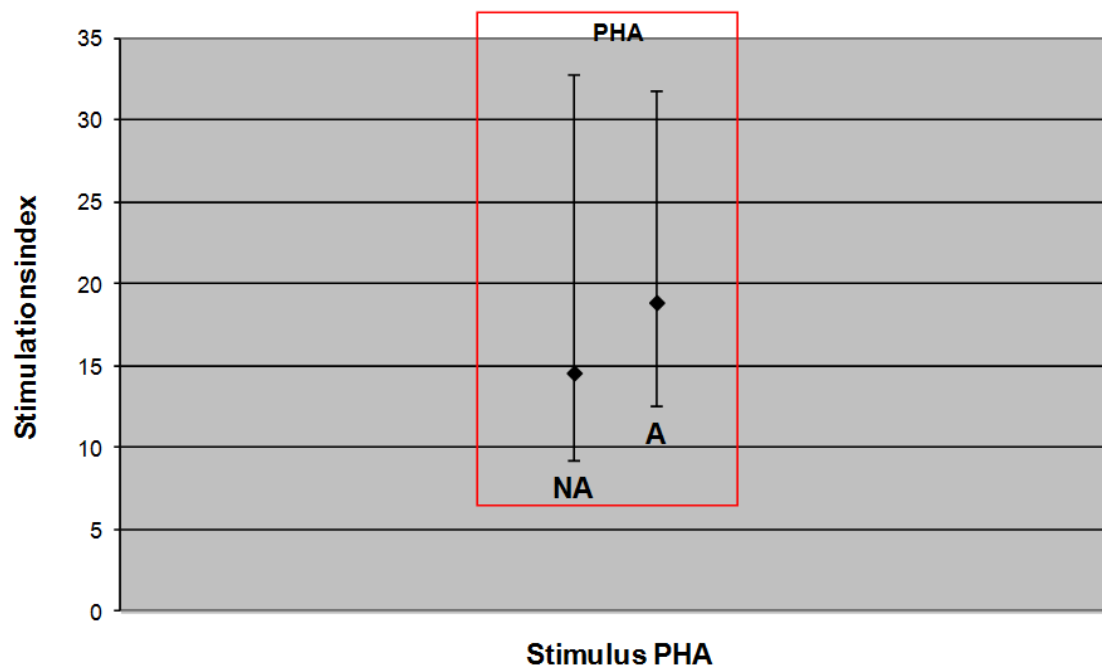
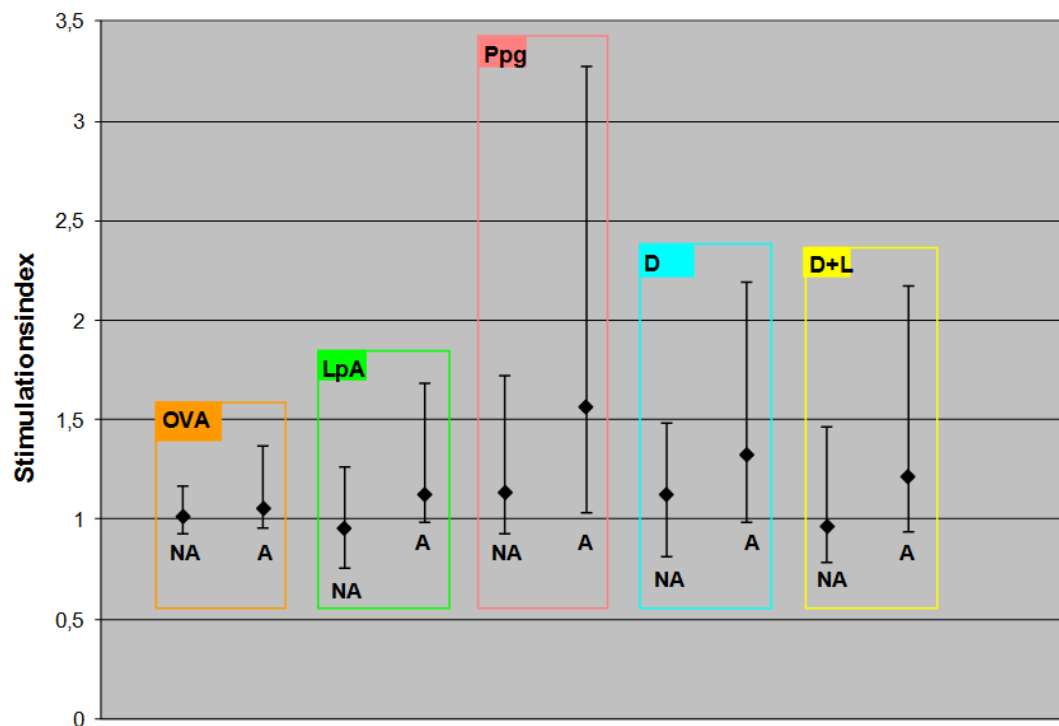


Abbildung 16: Stimationsindizes der CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer (A) Mütter nach Stimulation mit OVA, LpA, Ppg, D und D&L [LpA] (25. und 75. Perzentile)



### 3.5 Expression von Treg-assoziierten Genen

#### Erniedrigte Expression der Treg-assoziierten Gene FoxP3, GITR (TNFRSF18), LAG3 und CTLA4 in CBMCs atopischer Mütter (A)

Nach Stimulation mit LpA und Ppg zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen CBMCs (A) und CBMCs (NA) in der Expression von GITR (LpA  $p < 0,009$ ; Ppg  $p < 0,02$ ); die Expression des Gens war bei den CBMCs (A) signifikant erniedrigt (Abbildung 17). Für LAG3 lässt sich ebenfalls bei Stimulation mit Ppg eine signifikant erniedrigte Expression ( $p < 0,04$ ) bei den CBMCs (A) nachweisen, auch die Stimulation mit LpA ( $p < 0,06$ ) und D+L ( $p < 0,07$ ) zeigte einen Trend für beide Gruppen NA und A. Für FoxP3, CTLA4 und TGF $\beta$  konnte keine Signifikanz aufgezeigt werden.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 17 bis Abbildung 21) wird jeweils die Expression eines Treg-assoziierten Gens dargestellt; die Gruppen NA und A sind dabei gegenübergestellt und können im Vergleich betrachtet werden.

Abbildung 17: Expression von GITR (TNFRSF18) nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) mit signifikant erniedrigten Werten nach Stimulation mit LpA und Ppg (25. und 75. Perzentile)

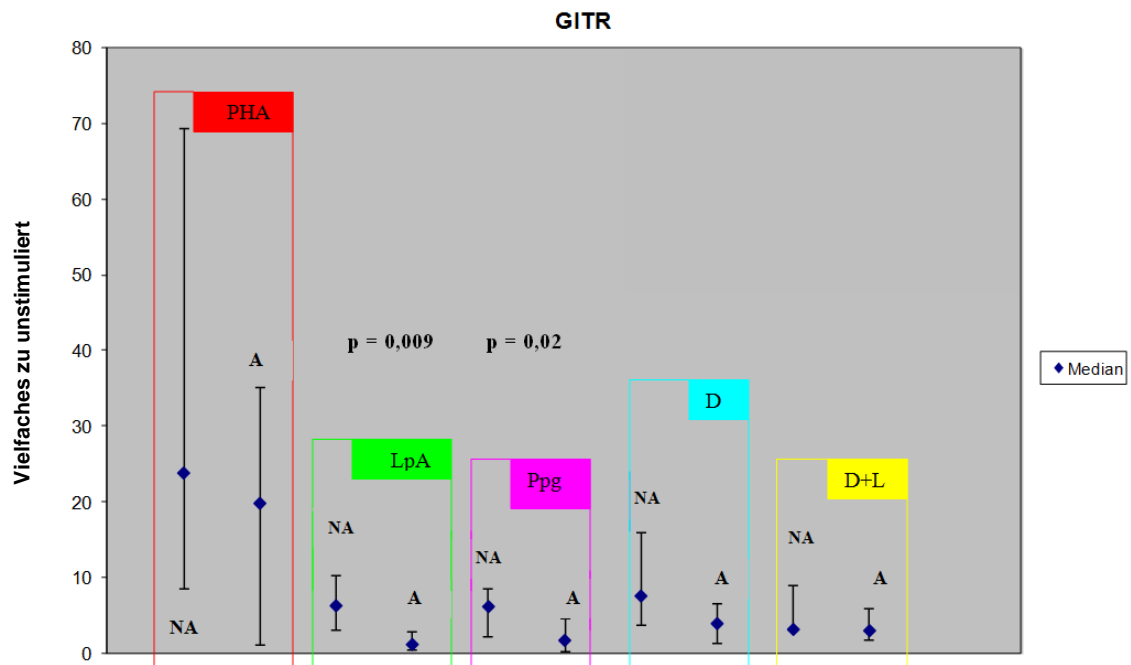


Abbildung 18: Expression von LAG3 nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) mit signifikant erniedrigtem Wert nach Stimulation mit Ppg (25. und 75. Perzentile)

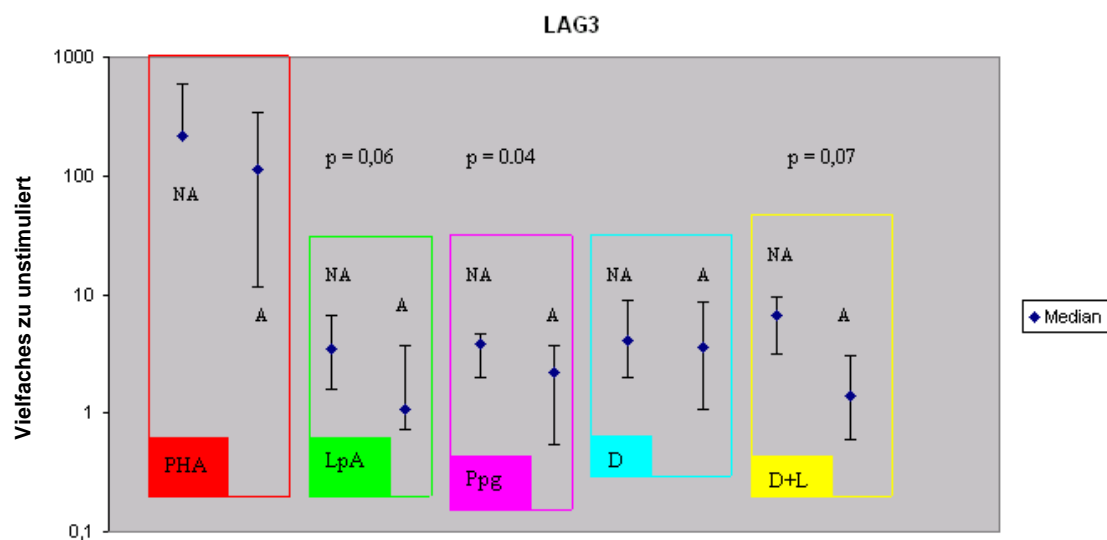




Abbildung 19: Expression von Foxp3 nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) (25. und 75. Perzentile)

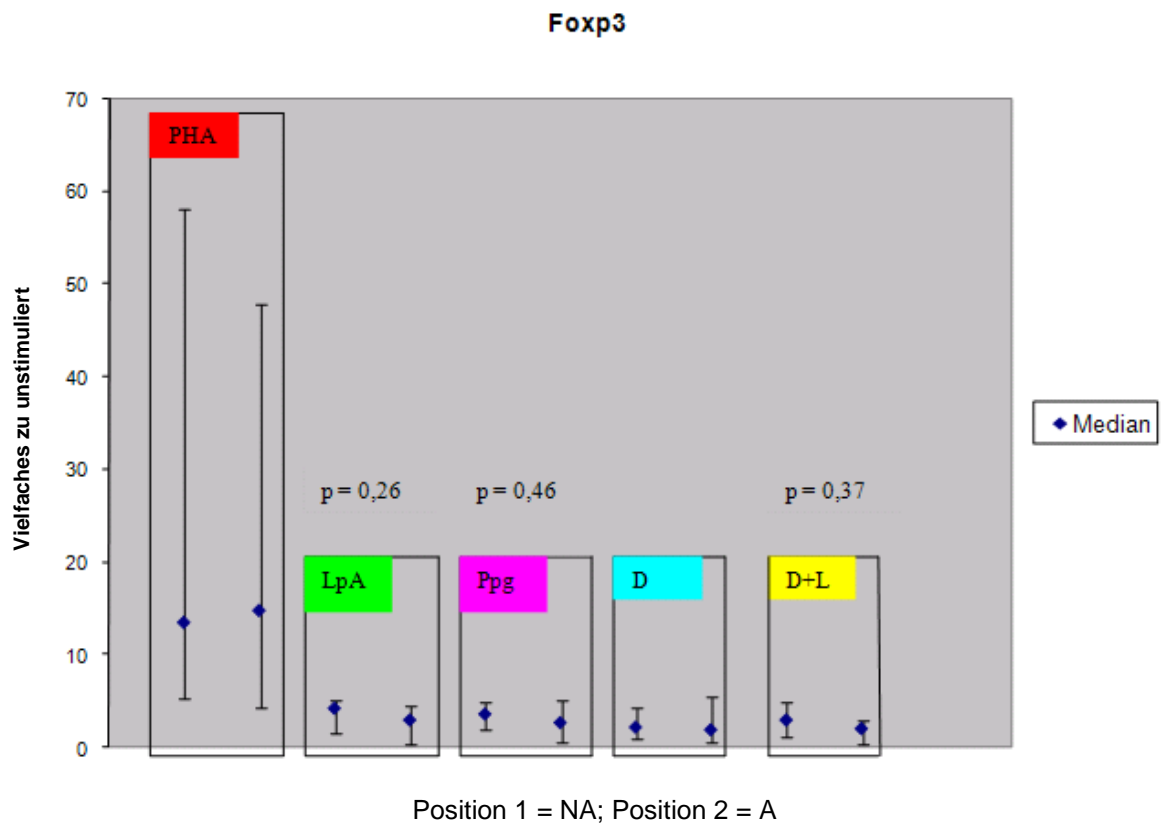


Abbildung 20: Expression von CTLA4 nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) (25. und 75. Perzentile)

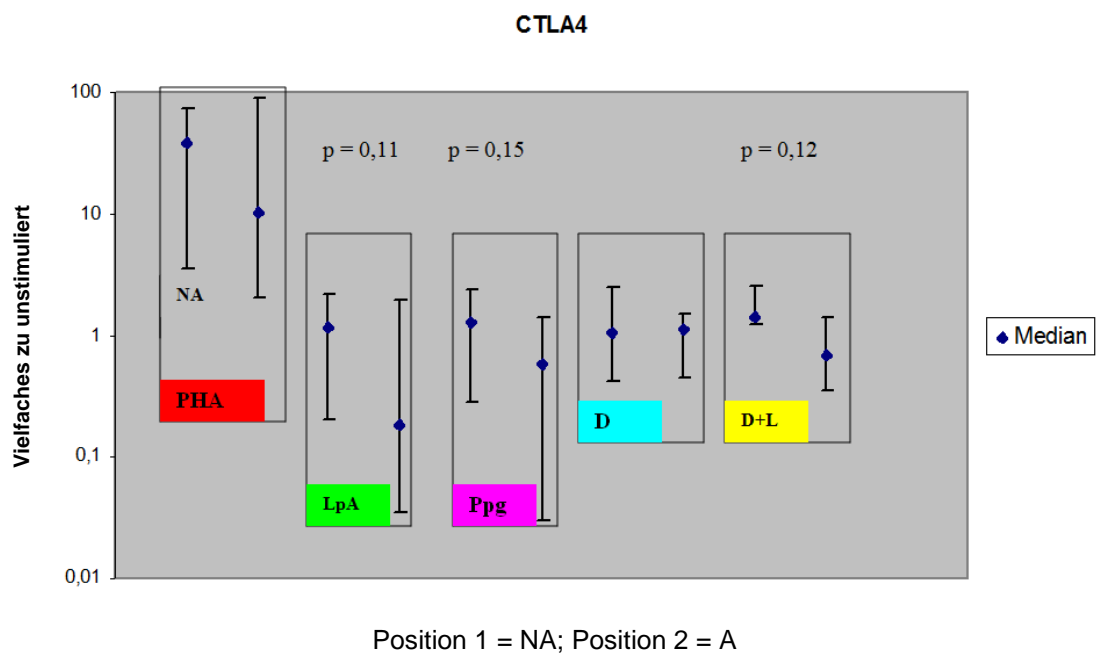
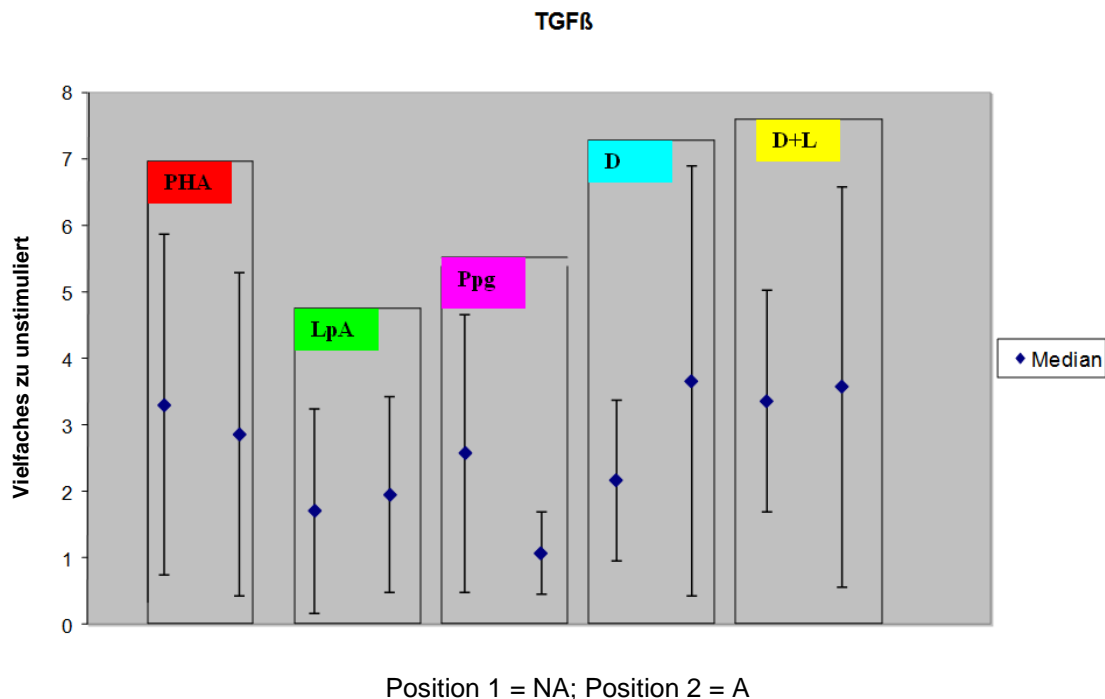


Abbildung 21: Expression von TGF $\beta$  nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) (25. und 75. Perzentile)



### 3.6 Korrelationen in der Genexpression Treg-assoziiierter Gene

#### Korrelationen in der Genexpression von GITR mit LAG3, GITR (TNFRSF18) mit FoxP3 und LAG3 mit FoxP3

Eine positive signifikante Korrelation dieser Gene zeigte sich für alle Stimuli, jedoch nicht für Ppg. Dabei ergab sich für die Stimulation mit PHA ( $p = 0,02$ ) bei den Atopikern zwischen den Genen GITR mit LAG3 und bei Stimulation mit D+L ( $p = 0,01$ ) zwischen GITR und FoxP3 eine spezifische Korrelation; dies bedeutet, dass eine reduzierte Expression von GITR mit einer ebenfalls verminderten Expression von LAG3/FoxP3 u.U. einhergeht.

Entscheidender als die Signifikanz ist dabei jedoch die Höhe des Korrelationskoeffizienten  $R^2$ ; dabei zeigt ein Wert von  $R^2 > 0,6$  eine gute Korrelation an. Sind die Gene gut korreliert, unterstreicht dies in diesem Zusammenhang ein spezifisches Ergebnis für die Zielgruppe der sog. regulatorischen T-Zellen und ihrer Marker/Gene.

Für GITR und LAG3 konnte eine hohe Korrelation in der nicht-atopischen Gruppe mit einem  $R^2$  von 0,68 aufgezeigt werden.

Mit PHA ( $p < 0,0001$ ) und D ( $p < 0,0001$ ) konnte dagegen bei den CBMCs (NA) eine signifikant positive Korrelation von GTR und LAG3 nachgewiesen werden (Abbildung 22 und Abbildung 23).

Die Maßstäbe der Korrelationsdiagramme enthalten im Vergleich zur Darstellung der Genexpression (fold difference = Vielfaches) auch Werte oberhalb der 75. Perzentile.

Abbildung 22: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (A) und (NA) mit hoher Korrelation von GTR (TNFRSF18) und LAG3 in der Gruppe der NA ( $R^2 = 0,68$ ) nach Stimulation mit PHA;  
 $R^2$  = Korrelationskoeffizient

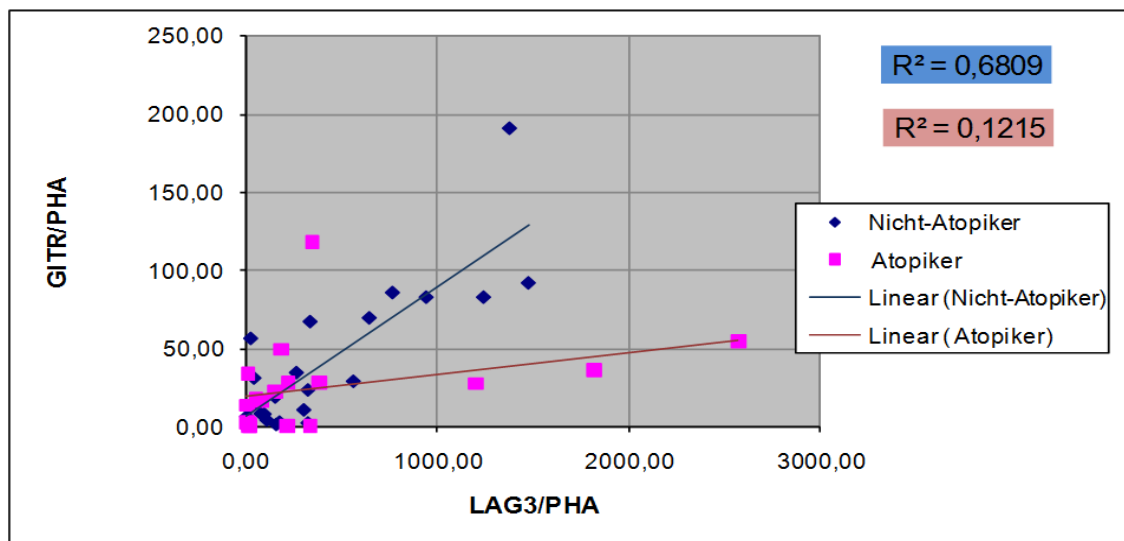
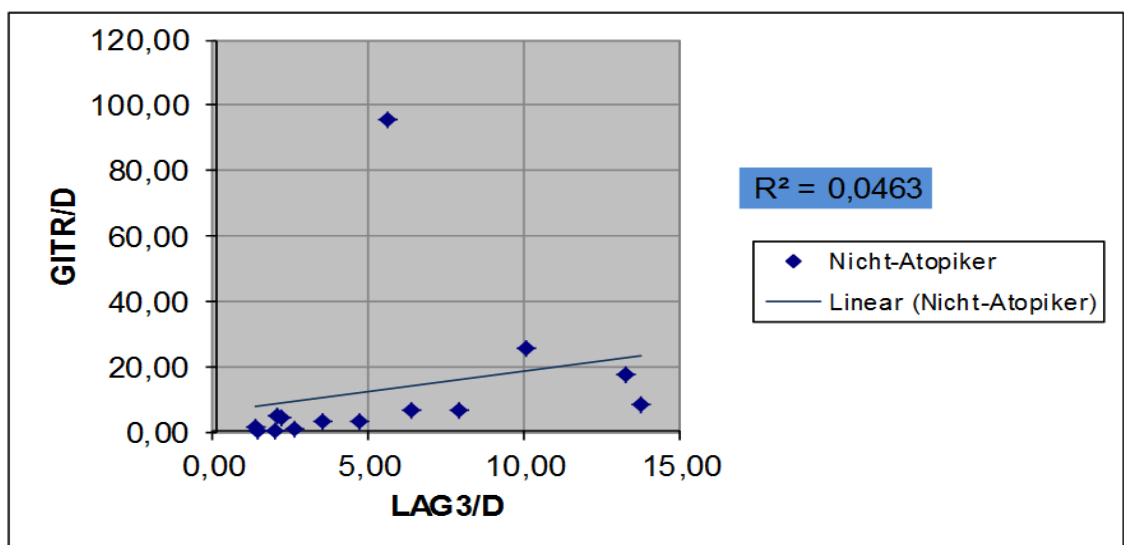


Abbildung 23: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (NA) zwischen GTR (TNFRSF18) und LAG3 nach Stimulation mit Hausstaubmilbe (D);  
 $R^2$  = Korrelationskoeffizient



Die Korrelationsgruppen GITR mit FoxP3 und LAG3 mit FoxP3 waren beide signifikant für die CBMCs (NA) bei Stimulation mit D+L ( $p \leq 0,02$ ) und PHA ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) – Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26 – und für GITR/FoxP3 auch bei D-Stimulation ( $p = 0,01$ ) – [keine graphische Abbildung zu GITR/FoxP3/D].

Eine hohe Korrelation konnte in der Gruppe der Nicht-Atopiker zwischen den Genen GITR/FoxP3 ( $R^2 = 0,78$ ) und für LAG3/FoxP3 ( $R^2 = 0,63$ ) jeweils unter Stimulation mit PHA gezeigt werden. Eine höhere Expression von GITR und LAG3 führt demnach zu einer höheren Expression von FoxP3 u.U.

Abbildung 24: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (A) und (NA) zwischen GITR (TNFRSF18) und FoxP3 nach Stimulation mit Hausstaubmilbe D & Lipid A (D+L);  $R^2$  = Korrelationskoeffizient

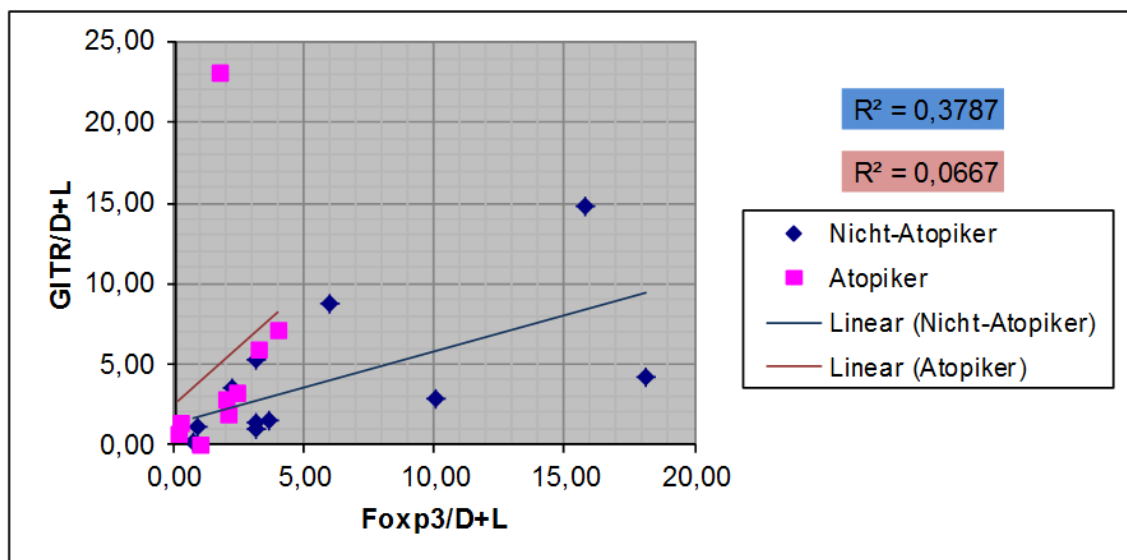


Abbildung 25: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (NA) mit hoher Korrelation ( $R^2 = 0,78$ ) zwischen GITR (TNFRSF18) und FoxP3 nach Stimulation mit PHA;  $R^2$  = Korrelationskoeffizient

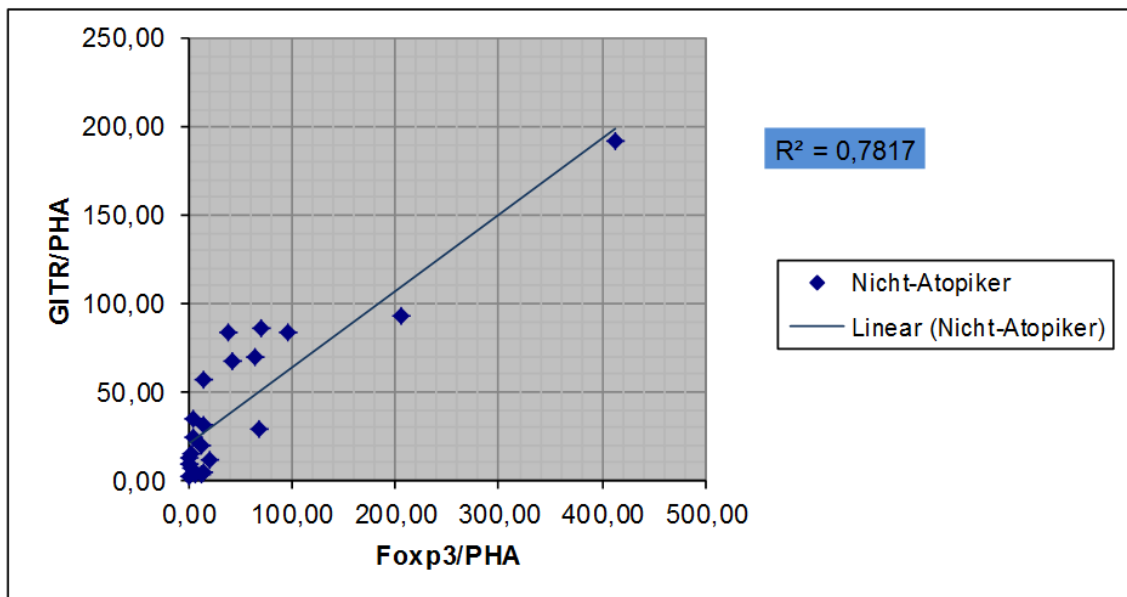
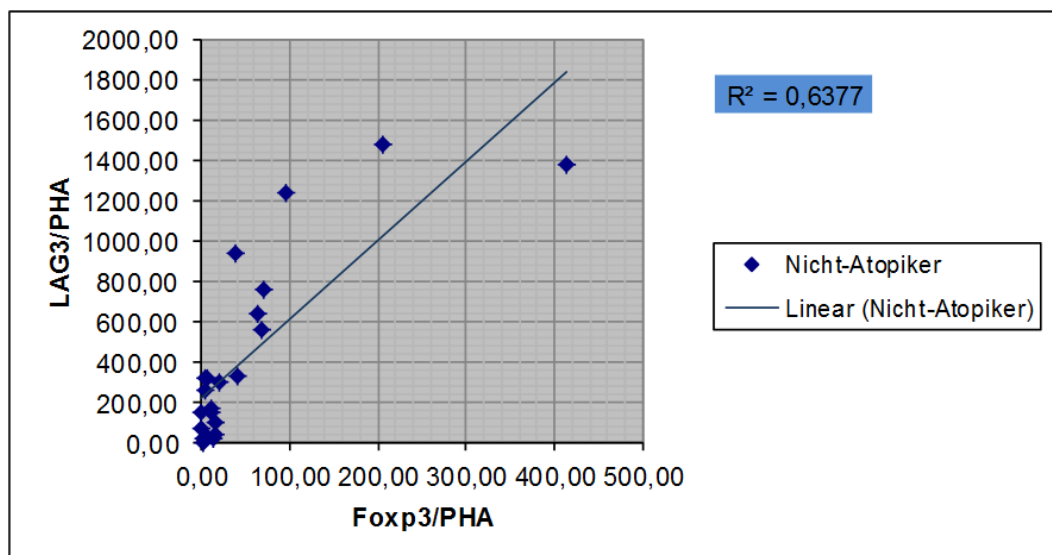


Abbildung 26: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (NA) mit hoher Korrelation ( $R^2 = 0,64$ ) zwischen LAG3 und FoxP3 nach Stimulation mit PHA;  $R^2$  = Korrelationskoeffizient



### **3.7 Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten im Nabelschnurblut (Durchflusszytometrie)**

#### **Signifikant geringere Anzahl von regulatorischen T-Lymphozyten im Nabelschnurblut atopischer Mütter**

Für die Durchflusszytometrie habe ich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. Wagner-Höppler Nabelschnurblut rekrutiert und in der anschließenden Verarbeitung die Separation mononukleärer Zellen (CBMCs) durchgeführt.

Anhand der Durchflusszytometrie konnte Dr. S. Wagner-Höppler (Dissertation: Modulation allergischer Erkrankungen durch mikrobielle Stimulation – eine Studie an Zellen des Nabelschnurbluts) in der Arbeitsgruppe folgende Ergebnisse gewinnen:

Bereits in nicht-stimulierten CBMCs (A) fällt eine reduzierte Anzahl von regulatorischen T-Zellen auf und innerhalb dieser Gruppe der CBMCs (A) wurde nach Stimulation mit LpA ( $p = 0,005$ ) dann eine signifikant erniedrigte Expression der für die Tregs spezifischen Oberflächenrezeptoren „CD4+CD25+hoch“ gemessen. Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen ist somit im Nabelschnurblut atopischer Mütter unter Stimulation mit LpA signifikant erniedrigt.

Dies unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation bzgl. der erniedrigten Genexpression der T-reg-assoziierten Gene nach Stimulation mit LpA.

Nach Adjustierung für die *Confounder* [Geburtsparameter (Körpergröße, -länge und Kopfumfang) sowie mütterliche & väterliche Atopie] zeigten sich unverändert signifikante Ergebnisse für die Expression der Treg-Oberflächenmarker. Diese *Confounder* nahmen somit keinen Einfluss.

### **3.8 Zytokinsekretion bei CBMCs (A) nach Stimulation**

#### **Reduzierte Zytokinsekretion bei CBMCs (A) nach Stimulation der CBMCs**

Nach Stimulation der CBMCs, welche ich mit Frau Dr. S. Wagner-Höppler aus dem Nabelschnurblut separiert habe, wurde der Zellüberstand abgenommen und die Zytokinmessung durchgeführt.

Die von Dr. S. Wagner-Höppler (Dissertation: Modulation allergischer Erkrankungen durch mikrobielle Stimulation – eine Studie an Zellen des Nabelschnurbluts) durchgeführten Zytokinmessungen ergaben in der Zytokinsekretion der mononukleären Zellen von Neugeborenen atopischer Mütter folgende Zusammenhänge und die in Punkt 3.9 genannten Korrelationen:

Nach Stimulation mit LpA konnte im Nabelschnurblut der Neugeborenen von atopischen Müttern eine signifikante Reduktion der Zytokinsekretion von INF-gamma und IL10 verzeichnet werden ( $p = 0,04$ ;  $p = 0,05$ ).

Die Stimuli D und D+L zeigten ebenfalls bei den CBMCs (A) eine Tendenz für eine signifikant erniedrigte IL10 und IFN-gamma Sekretion.

Die Zytokinproduktion von INF-gamma und IL10 war auch bei allen anderen Stimuli in der atopischen Gruppe erniedrigt, jedoch nicht signifikant.

### **3.9 Korrelation zwischen Zytokin IL10 und Treg-assoziierten Genen**

#### **Positiv signifikante Korrelation von IL10 bei PHA induzierter Expression von GITR und LAG3**

IL10 zeigte ausschließlich bei PHA induzierter Expression von GITR und LAG3 eine positive signifikante Korrelation (IL10/GITR  $p = 0,03$ ; IL10/LAG3  $p = 0,02$ ).

Keine Stimulation, inklusive PHA zeigte eine signifikante Sekretion von IL10 in Zusammenhang mit FoxP3.

Auch diese Daten [erniedrigte Zytokinsekretion in den CBMCs (A) und Korrelation von Zytokin IL10 mit Treg-assoziierten Genen] bestätigen die Zusammenhänge, die in der vorliegenden Arbeit geschlussfolgert werden konnten.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit und Kohortenstudie PAULINA wurde der Einfluss mütterlicher Atopie auf die Immunregulation im Nabelschnurblut untersucht.

Ziel der Studie war, den Einfluss mütterlicher Atopie auf die Immunantwort regulatorischer T-Zellen nach Stimulation „*innate & adaptive*“ zu beurteilen. Im Speziellen wurde die Expression von Treg-assoziierten Genen, wie FoxP3, LAG3, GITR (TNFRSF18), CTLA4 und TGF $\beta$  innerhalb dieser Arbeit mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht.

Von Interesse war dabei im Besonderen der Vergleich von CBMCs innerhalb der beiden Gruppen atopischer (A) und nicht-atopischer (NA) Mütter; untersucht wurde, ob mononukleäre Zellen (CBMCs) aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen bei Vorliegender maternaler Atopie eine veränderte bzw. eingeschränkte Funktion/Genexpression aufweisen.

Schließlich zeigte sich auch eine niedrigere Expression von Treg-assoziierten Genen, signifikant waren diese Ergebnisse für das *Glukokortikoid-Induzierte-Tumornekrosefaktor-Related-Protein* (GITR = TNFRSF18) und *Lymphozyten-Aktivierendes-Antigen 3* (LAG3). Keine Signifikanz, jedoch ein Trend war beim Transkriptionsfaktor *Forkhead box family P3* (FoxP3), *Cytotoxischem-Lymphozyten-Antigen 4* (CTLA4) und *T-Lymphocyte-Growth-Factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) nach Stimulation mit Ppg und LpA festzustellen.

Die signifikant erniedrigte Expression Treg-assoziiierter Gene bei Atopikern nach Stimulation mit spezifischen Stimuli des angeborenen Immunsystems (Ppg & LpA) gibt somit Hinweise darauf, wie wichtig die frühzeitige Stimulation des fetalen Immunsystems ist und dass sich eine atopische Grunderkrankung der Mutter auf die regulierenden Mechanismen früher immunologischer Vorgänge auswirkt und dadurch möglicherweise die weitere Entstehung von Atopie im Kindesalter bahnen kann.

Bekannt ist bereits, dass bei allergisch prädisponierten Kindern und Allergikern das initial, also unmittelbar postnatal bestehende Überwiegen von TH-2 Zellen bestehen bleibt (Prescott et al. 1999) und sich bei nicht allergisch belasteten Kindern die TH-1-Zellreihe ab Geburt dagegen vorrangig entwickelt. Da man bereits seit einigen Jahren die zusätzliche Erkenntnis gewonnen hat, dass das Gleichgewicht zwischen TH-1-Zellen und TH-2-Zellen auch nachweislich durch regulatorische T-Zellen beeinflusst wird, wurden in dem dieser Studie zugrunde liegenden Experiment die regulatorischen T-Lymphozyten untersucht.



Neben der Analyse der Genexpression der o.g. Gene, die die regulatorischen T-Lymphozyten charakterisieren, wurde in der PAULINA-Studie auch die Anzahl der „CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hoch“ – regulatorischen T-Zellen innerhalb der aus dem Nabelschnurblut isolierten CBMCs ausgewertet; die CBMCs atopischer Mütter weisen nach Stimulation mit LpA und Ppg eine geringere Anzahl von Tregs auf. Dies bestätigt die Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit.

Außerdem wurde in vielen Studien aufgezeigt, dass der Kontakt mit mikrobiellen Substanzen bereits pränatal und besonders auch im ersten Lebensjahr eines Kindes zu einer Reduktion allergischer Prädisposition bzw. Erkrankung führt.

Somit stellt sich die Frage, ob schon intrauterin eine unterschiedliche Modulation regulierender Immunmechanismen entstehen kann, nicht nur beeinflusst durch Stimuli des Immunsystems, sondern möglicherweise zusätzlich durch mütterliche Atopie. Die Reaktion des Immunsystems von Feten und Neugeborenen gegenüber Umwelteinflüssen kann somit evtl. zusätzlich durch mütterliche Faktoren schon zum Zeitpunkt des *intrauterinen* Stadiums beeinflusst werden. Dafür spricht auch, dass sich allergische Erkrankungen bereits im frühen Kindesalter manifestieren. Die zu Grunde liegenden Zusammenhänge sind im Hinblick auf die Komponente der mütterlichen atopischen Grunderkrankung jedoch im Einzelnen bisher nicht vollständig beschrieben und verstanden.

### **Treg-assoziierte Gene und Genexpression in CBMCs (A) und (NA)**

Die mit den regulatorischen T-Zellen assoziierten Gene sind FoxP3, LAG3, GITR (TNFRSF18), CTLA4 und TGFβ. Diese wurden mit der Polymerase-Ketten-Reaktion als Hauptexperiment dieser Arbeit nach Stimulation mononukleärer Zellreihen bezüglich ihrer Expressionsrate untersucht. Differenziert wurden mononukleäre Zellen aus dem Nabelschnurblut atopischer Mütter und nicht-atopischer Mütter. Da die oben genannten Gene mit regulatorischen T-Zellen maßgeblich assoziiert sind und FoxP3, der aktuell spezifischste Marker für die Tregs ist, war gewährleistet, dass diese Zellpopulation dadurch spezifisch betrachtet wurde.

### **FoxP3 – Forkhead Box Family Transkription Factor P3**

Der Transkriptionsfaktor FoxP3, dessen Expression ein hochspezifisches Merkmal der „CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hoch“ – regulatorischen T-Zellen darstellt und der die Entwicklung dieser Subgruppe von T-Lymphozyten sowie deren Funktion mit beeinflusst, stellte eines jener, in dieser Studie untersuchten Gene dar.

In der PAULINA-Studie konnte in der PCR eine Tendenz zu einer geringer ausgeprägten Expression von FoxP3 in CBMCs atopischer Mütter aufgezeigt werden, jedoch ergab sich bei den verschiedenen Stimuli, mit denen die Zellen stimuliert wurden, keine Signifikanz. Da sich in den Ergebnissen der Durchflusszytometrie der Arbeitsgruppe jedoch speziell für den Stimulus LpA eine signifikant erniedrigte Anzahl von regulatorischen T-Zellen im Nabelschurblut von Atopikern ergab und auch für die anderen Stimuli eine geringere (jedoch nicht signifikante) Anzahl der für diese Zellen spezifischen „CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hoch“-Oberflächenmarker zeigte, war der zu verzeichnende Trend einer FoxP3 Minderexpression im atopischen Nabelschnurblut so nicht erwartet worden.

In diesem Zusammenhang muss jedoch beachtet werden, dass auch andere Subgruppen von Lymphozyten wie die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen und die CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls, jedoch weniger stark, FoxP3 exprimieren. Dennoch ist dieser Transkriptionsfaktor der *forkhead box family* aufgrund seiner hohen Expressionsrate, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein spezifischer Marker für die Gruppe der regulatorischen T-Zellen.

Das FoxP3-Gen, funktionell als Transkriptionsfaktor bekannt, ist für die Entwicklung und letztendlich die suppressive Funktion der regulatorischen T-Zellen notwendig.

Die Funktion dieser „CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hoch“ – regulatorischen T-Zellen liegt in der Expression von antiinflammatorischen (suppressiven) Zytokinen wie IL10 und TGFβ und in der Erhaltung einer natürlichen Toleranz des Immunsystems gegenüber Antigenen wie Autoantigenen und Allergenen (Karagiannidis 2004).

Die Mutation von FoxP3 führt zu immunologischer Dysregulation, die zu Krankheitsbildern wie beispielsweise dem IPEX-Syndrom führen. Gekennzeichnet ist diese Krankheit durch eine Polyendokrinopathie mit massiver Lymphozytose, einem sich früh manifestierenden insulinabhängigen Diabetes mellitus, einer Thyreoiditis, ekzemartigen Hautveränderungen und schweren Nahrungsmittelallergien. Andere autoimmune Pathologien sind Enteropathien, hämolytische Anämien und Thrombozytopenien. Ursächlich ist dafür die polyklonale Aktivierung lymphozytärer Zellen, wie CD4<sup>+</sup> T-Zellen und von, wenn auch in geringerem Ausmaß, CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Aus diesen Feststellungen heraus, wird angenommen, dass FoxP3 als Transkriptionsfaktor eine regulatorische Funktion bezüglich der T-Zell-Aktivierung trägt, in dem es die überschießende Aktivität dieser Zellreihen unterbindet (Fontenot/Rudensky 2005).

Sind die regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut von Atopikern nun einerseits durch eine geringere Anzahl und andererseits zusätzlich durch eine geringere Expression von FoxP3 gekennzeichnet, kann die daraus resultierende verminderte Aktivität

der Tregs bzw. deren reduzierte Suppressionsfunktion zu einer überschießenden Reaktion auf Allergene führen.

### **GITR – Glukokortikoid-Induzierter-Tumornekrosefaktor-Rezeptor (=TNFRSF18)**

Regulatorische T-Zellen sind außerdem durch die hohe Expression von Glukokortikoid-Induziertem-Tumornekrosefaktor-Rezeptor (GITR) gekennzeichnet; spezifisch ist dieser Oberflächenmarker jedoch für die Tregs nicht, da er zudem auch auf nicht-aktivierten  $CD25^+$  T-Zellen erscheint und von  $CD4^+ CD25^-$  und  $CD8^+ CD25^-$  T-Zellen (Antwort-T-Zellen) sowie von B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Dieser Rezeptor gehört zu der *Tumornekrosefaktor Superfamily*.

In den Ergebnissen der PCR dieser Studie wurde eine signifikante Minderexpression des GITR-Gens im Nabelschnurblut von Kindern atopischer gegenüber nicht atopischer Mütter verzeichnet. Stephens et. al beschreiben parallel dazu, dass in heterozygoten GITR+/- Mäusen, welche eine herabgesetzte Expression von GITR aufwiesen auch eine reduzierte Anzahl von „ $CD4^+ CD25^+$  hoch“ regulatorischen T-Zellen festgestellt werden konnte (Shevach/Stephens 2006); auch in der PAULINA-Studie wurde im Nabelschnurblut von Neugeborenen atopischer Mütter neben der GITR Reduktion ebenfalls eine reduzierte Anzahl von Tregs im Nabelschnurblut festgestellt.

An den GIT-Rezeptor (TNFRSF18) bindet der GITR-Ligand (GITR-L = TNFSF18), welcher von antigenpräsentierenden Zellen und allgemein von T-Zellen nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors produziert wird. Die Interaktion von Rezeptor (GITR) und seinem Liganden (GITR-L) an der Oberfläche von sog. Antwort-T-Zellen führt indirekt, ohne die Tregs beispielsweise direkt zu eliminieren, zu einer herabgesetzten Treg vermittelten Suppressionsfunktion. Bemerkenswert ist, dass nachgewiesen werden konnte, dass die Bindung von Ligand und Rezeptor an den regulatorischen Zellen selbst diese Wirkungsabschwächung nicht zur Folge hat; die Bindung muss an nicht-regulatorischen T-Zellen erfolgen (Shevach/Stephens 2006).

Durch die Bindung von GITR und GITR-Ligand wird innerhalb einer immunologischen Reaktion IL2 sezerniert, welches die Differenzierung in Effektor-Zellen und das Überleben von T-Zellen ermöglicht. Die Interaktion von regulatorischen T-Lymphozyten mit dendritischen Zellen in Gegenwart von IL2 bewirkt eine Aktivierung der Tregs und deren Expansion. Die Induktion der Expression des GITR-Liganden (Antwort-T-Zellen), welche zu Beginn einer antiinflammatorischen Reaktion zu Stande kommt, ist zu diesem Zeitpunkt und für den Verlauf der immunologischen Prozesse von großer Bedeutung, da dadurch zunächst eine effiziente Abwehr ohne Unterdrückung durch die Tregs zustande kommen kann (McHugh et al. 2002). Im Laufe der Reaktion wird die in den-

dritischen Zellen und  $CD4^+ CD25^-$  und  $CD8^+ CD25^-$  T-Zellen initiierte Expression von GITR und dessen Ligand wieder eingestellt bzw. normalisiert; dadurch wird durch die auf den Antwort-Zellen nun fehlende Interaktion zwischen GITR und Ligand die Reagibilität dieser Immunzellen gegenüber der Suppression der regulatorischen T-Zellen erhalten bzw. wieder verstärkt. Im weiteren Verlauf wird dadurch eine mögliche immunologische Überreaktion vermieden.

Stephens et. al beschreiben dazu ferner, dass eine Signaltransduktion via *Toll-Like-Rezeptoren* sowie ablaufende inflammatorische Prozesse zu einer Down-Regulation von GITR-Ligand führen und eine Erhöhung der Sensibilität von Effektor-Zellen gegenüber einer Treg induzierten Suppression zur Folge haben (Stephens et al. 2004). Durch die Stimulation der CBMCs mit LpA in der PAULINA-Studie wurde eine Signalkaskade über Aktivierung der *Toll-Like-Rezeptoren* induziert und damit die Expressionsrate von TNFRSF18 und dessen Ligand beeinflusst. Die Reduktion von GITR in CBMC von atopischen Müttern kann damit erklärt werden, dass es hier möglicherweise zu einem negativen Feedback-Mechanismus kommt, um die Funktion der Tregs zu aktivieren und überschießende Immunreaktionen einzudämmen; die Expression von GITR könnte vermindert werden, um eine bessere Suppressionskapazität der Tregs zu ermöglichen.

GITR kann folglich eine costimulierende Aufgabe zugeschrieben werden, indem die Interaktion zwischen Tumornekrose-Faktor-Rezeptor und Ligand die Funktion einerseits der Antwort-T-Zellen und andererseits der regulierenden T-Zellen beeinflussen.

#### **CTLA4 – zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4**

Das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 ist ein konsequent an der Zelloberfläche der regulatorischen T-Zellen lokalisiertes Protein; auch als CD152 beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das zu Grunde liegende CTLA4 – Gen nach Stimulation in CBMCs untersucht.

In den Ergebnissen der CTLA4 Genexpression der hier durchgeführten PCR konnte in CBMCs (A) und dessen Tregs eine Minderexpression gegenüber den CBMCs (NA) nachgewiesen werden.

CTLA4 spielt eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Gleichgewichtes immunologischer Reaktionen. Seine Expression wird nach Aktivierung der regulatorischen T-Zellen verstärkt und führt via Funktion eines Negativ-Regulators zu einer Inhibierung von immunologischen Zellen und deren Aktivität sowie zu verminderter IL2 Produktion und Hemmung des Ablaufs von Zellzyklen.

Wird CTLA4 blockiert, beispielsweise durch einen Antikörper (anti-CTLA4-Ak), konnte man feststellen, dass es zu verstärkter Effektor-T-Zell Reaktion und damit einhergehender erhöhter T-Zell-vermittelter Tumorbekämpfung, einer herabgesetzten Toleranz gegenüber spezifischen Antigenen und einer Exazerbation von Autoimmunreaktionen kommt.

Damit konnte auch aufgezeigt werden, dass durch die Inaktivierung dieses Oberflächenmoleküls möglicherweise eine Beeinträchtigung der Funktion der regulatorischen T-Zellen resultiert. In CTLA4-defizienten Mäusen wurde die tragende Rolle des Oberflächenmoleküls mit seiner negativ-regulierenden Funktion ebenfalls nachgewiesen; diese Tiere entwickelten fatale lymphoproliferative Krankheiten und multiple andere Organschäden (Read et al. 2000).

Da das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 für eine regulierende Funktion und damit einhergehende Hemmung von genereller T-Lymphozyten-Aktivität verantwortlich zu sein scheint, kann die verminderte Genexpression eine unkoordinierte, verstärkte, nicht ausgewogene T-Zell-Präsenz und zu hohe Aktivität dieser Zellen zur Folge haben, welche sich in allergischen Reaktionen somit bereits im frühen Kindesalter zeigen kann.

### **TGFβ – Transforming Growth Factor β**

TGFβ ist ein Polypeptid und gehört der *Transforming Growth Factor beta superfamily* der Zytokine an. Aufgrund seiner potenten immunregulativen Fähigkeiten, innerhalb derer es sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte bewirken kann, beeinflusst es zelluläre Funktionen wie Zellwachstum und Proliferation sowie die Zelldifferenzierung und Apoptose. Alle Formen von Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen und dendritische Zellen sowie lymphozytäre Zellreihen bilden dieses Peptid. (Letterio und Roberts, 1998).

Die regulatorischen T-Zellen können durch die Sekretion von TGFβ und dessen Wirkprofil ihre immunsuppressive bzw. regulatorische Wirkung in immunologischen Prozessen vermitteln. Aus diesen Informationen hervorgehend ist dadurch ersichtlich, dass die herabgesetzte Expression von TGFβ, die in der PAULINA-Studie im Nabelschnurblut von Kindern atopischer Mütter aufgezeigt werden konnte, entzündlichen bzw. allergischen Reaktionen Vorschub leisten kann.

Für das Zytokin TGFβ wurde eine vor allem hemmende Wirkung auf die Zellfunktion sowie auf immunologische und entzündliche Vorgänge nachgewiesen. Den Beweis lieferten Experimente an Mäusen mit eradiziertem TGFβ-Gen, sog. TGFβ-null-Mäuse,

die schwere Inflammationsprozesse und schließlich Organversagen mit tödlichen Folgen innerhalb einer Lebensdauer von 3 Wochen erlitten (Kulkarni et al. 1993).

Die Bedeutung dieses Treg-assoziierten Gens und des daraus exprimierten Zytokins für die Homöostase der T-Zell-Regulation wurde auch in Studien demonstriert, in welchen in Tierexperimenten TGF $\beta$  bei allergischer Enzephalomyelitis und bei Transplantatreaktionen verabreicht wurde und dadurch den klinischen Verlauf maßgeblich positiv beeinflusste (Kuruwilla et al. 1991).

Wie TGF $\beta$  die Zellfunktion direkt beeinflussen kann wurde anhand der Mastzellen beschrieben. Die Aktivierung dieser Zellen und die resultierende Histaminausschüttung nach Bindung von IgE an den hoch affinen IgE-Rezeptor der Mastzellen wird durch TGF $\beta$  gehemmt. Auch konnte nachgewiesen werden, dass das Zytokin den Reifungsprozess dieser Zellen verhindern kann.

Neben den Mastzellen sind auch die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Zielzellen von TGF $\beta$ . Dies wurde bewiesen durch den Einsatz von anti-CD4-Antikörper, welcher sich in den „TGF $\beta$ -null-Mäusen“ als wirksam erwiesen hat, um die fatalen immunologischen Prozesse bei diesen Tieren zu verhindern (Gomez et al. 2005).

Das mit den regulatorischen T-Zellen assoziierte Gen TGF $\beta$  nimmt somit direkten Einfluss auf die Regulation des Immunsystems, verhindert autoimmunologische Reaktionen und hemmt die Mastzelldegranulation und repräsentiert somit einen wichtigen Faktor in der regulatorischen Funktion der Tregs.

### **LAG3 – Lymphozyten-Aktivierendes Gen 3**

Lymphozyten-Aktivierendes Gen 3 wird ebenfalls von Subpopulationen von T-Zellen und auch von regulatorischen T-Zellen exprimiert; das LAG3 Protein gehört zu der Familie der Immunglobuline und ist an der Zelloberfläche von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen zu finden.

Das LAG3-Gen, wie in diversen Studien bereits gezeigt wurde, ist nicht nur ein weiteres unspezifisches Markermolekül der Tregs, sondern es wird für die optimale Funktionsfähigkeit dieser regulatorischen Zellen benötigt.

Wird LAG3 durch einen bindenden Antikörper blockiert, wird die durch die Tregs vermittelte Suppression vermindert; die Zellproliferation wurde in vitro in Gegenwart der Suppressor-Zellen nun nicht mehr entsprechend eingedämmt. Auch in vivo konnte die verminderte bzw. fehlende Modulation durch die Tregs beobachtet werden (Huang et al. 2004).

Im PCR-Experiment dieser Dissertation konnte aufgezeigt werden, dass bei maternalen Atopie im Nabelschnurblut LAG3 vermindert exprimiert wird und zusätzlich konnte auch eine erhöhte Zellproliferation der CBMCs (A) nach Stimulation mit Ppg, Hausstaubmilbe D.p. und PHA nachgewiesen werden.

Außerdem beeinflusst das LAG3-Protein durch seine Bindung an das MHC-II-Rezeptor-Protein Reifungs- und Aktivierungsprozesse dendritischer Zellen und konvertiert sie dadurch in funktionsfähige antigenpräsentierende Zellen, die allgemein T-Zell-gesteuerte Immunantworten initiieren können (Andreae et al. 2002).

Die dem Asthma bronchiale zu Grunde liegende Hyperreagibilität und damit einhergehende Konstriktion der glatten Muskulatur des Bronchialsystems wird durch LAG3+ regulatorische T-Zellen beeinflusst (Strickland et al. 2006).

Die LAG3+Tregs beeinflussen diese Pathologien der Atemwege, indem sie die Aktivität antigen-spezifischer T-Lymphozyten und die Expression des Oberflächenmoleküls CD 86 an der Zelloberfläche von dendritischen Zellen hemmen. CD86 ist ein „Kommunikations- und Aktivierungsfaktor“, der nach Allergenkontakt innerhalb der Mucosa die Mobilisierung von dendritischen Zellen in die nächstgelegenen Lymphknotenstationen bewirkt. Durch die Suppressionsfunktion der Tregs werden dadurch weitere Zellkontakte zwischen dendritischen Zellen und über die Lymphknoten einwandernden immunologischen Zellen verhindert und die übermäßige Reagibilität der Atemwege verhindert (ebd.).

Ist nun das für die Funktion der „CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hoch“ - T-Zellen mit verantwortliche LAG3-Gen bei Atopikern niedrig exprimiert, besteht somit einerseits eine fehlende Down-Regulation von costimulierenden Molekülen sowie auch eine fehlende direkte Intervention durch protektive Tregs innerhalb der Kommunikationskette von dendritischen Zellen und T-Helfer-Zellen nach Kontakt mit einem inhalativen Allergen; folglich werden die Pathomechanismen z.B. in den Atemwegen nicht unterbunden.

Zusammenfassend kann als Ergebnis aus dieser Studie bereits im Nabelschnurblut von atopischen Müttern, also im angeborenen, noch nicht vollständig ausgereiften Immunsystem der Neugeborenen eine Minderexpression der Treg-assoziierten Gene festgehalten werden. Der Einfluss einer vorliegenden maternalen atopischen Disposition bzw. Erkrankung scheint somit die Entwicklung des Immunsystems bereits *in utero* zu beeinflussen bzw. zu beeinträchtigen. Die dargestellten molekulargenetischen Pathologien, die ggf. zu der Entstehung atopischer Erkrankungen beitragen, lassen vermuten, dass diese so bereits bei heranwachsenden Kleinkindern mit reduzierter Zahl

von regulatorischen T-Zellen greifen und die Ausprägung allergischer Reaktionen fördern können.

### **Ausblick**

Die Zusammenhänge in der Entwicklung des Immunsystems ausgehend von dem Zeitraum *in utero* bis zur Geburt einschließlich der dann resultierenden postnatalen immunologischen Vorgänge bilden die Basis für das Verständnis des atopischen Krankheitsbildes.

Unter dem Aspekt der bereits pränatalen Beeinflussung des frühkindlichen Immunsystems durch mikrobielle Stimuli können sich hier möglicherweise neue Behandlungs- und ggf. auch Präventionsansätze allergischer Erkrankungen ergeben.

Die Studie PAULINA hat wichtige immunologische Zusammenhänge von regulatorischen T-Lymphozyten und deren Genexpression bei Vorliegen mütterlicher Atopie und gleichzeitiger mikrobieller/allergener Stimulation von CBMCs erfasst.

Ein weiterer Aspekt der Studie ist, dass im Rahmen dieser longitudinalen Kohortenstudie die Kinder, deren Nabelschnurblut zum Zeitpunkt der Geburt untersucht worden ist, auch über die folgenden Jahre weiter beobachtet werden, um die individuelle Entwicklung von allergischen Erkrankungen im Zusammenhang mit den bisherigen Ergebnissen zu verfolgen und zu beurteilen.

Weiterführende Studien sind notwendig, um bisherige Ergebnisse zu untermauern und zu verifizieren und das Verständnis für die gegenseitige Beeinflussung von immunologischen Faktoren bei allergischen und atopischen Erkrankungen zu verbessern.



## Zusammenfassung

In der Studie PAULINA konnte ein Zusammenhang zwischen mütterlicher Atopie und der Funktion von aus dem Nabelschnurblut stammenden regulatorischen T-Lymphozyten aufgezeigt werden. Die regulatorischen T-Zellen sind bei Vorliegen mütterlicher Atopie nach Stimulation in ihrer Genexpression funktionell beeinträchtigt und beeinflussen somit möglicherweise das frühkindliche Immunsystem und die Entwicklung von allergischen Erkrankungen.

Zunehmend wird in zahlreichen Studien der mögliche Zusammenhang zwischen mütterlicher Atopie und allergischer Prädisposition der Kinder dieser atopisch erkrankten Mütter beschrieben (Amoudruz et al. 2005, Williams et al. 2000). Das frühkindliche, angeborene Immunsystem steht dabei im Vordergrund der wissenschaftlichen Ansätze; die Entwicklung dieses noch „unreifen“ Systems wird, wie in den letzten Jahren nachgewiesen wurde, maßgeblich durch den Kontakt mit mikrobiellen Substanzen im peri- und postpartalen Zeitraum und auch bereits in der Phase der Schwangerschaft beeinflusst. Es ist bekannt, dass bereits die Exposition der Schwangeren gegenüber bestimmten Stimuli im Sinne von Allergenen und Erregern die Modulation und das Gleichgewicht immunologischer Prozesse der Feten, Neugeborenen und heranwachsenden Kinder dadurch in eine Sensibilisierungsbereitschaft gegenüber Allergien gelenkt werden können. Diese Erkenntnis weist bereits darauf hin, dass nicht nur postpartale Infektionen und Allergen-Kontakte Auswirkungen nach sich ziehen, sondern schon *in utero* die Entwicklung der kindlichen Immunantwort für später gebahnt wird.

Welche Konsequenzen nun in diesem Zusammenhang die mütterliche Atopie für den Fetus bzw. das Neugeborene haben kann, ist Gegenstand der PAULINA-Studie gewesen.

In dieser Dissertation wurden mit Hilfe der *Real Time RT-PCR* Expressionsanalysen der Treg assoziierten Gene FoxP3, LAG-3, GITR, CTLA-4 und TGF $\beta$  im Nabelschnurblut von 50 Probanden (ausgewählt aus urspr. 118 Probanden) durchgeführt. Differenziert wurde zwischen den beiden Gruppen mononukleärer Zellen (CBMCs) aus dem Nabelschnurblut atopischer [CBMCs (A)] und nicht atopischer [CBMCs (NA)] Mütter. Die regulatorischen T-Zellen, eine spezielle Gruppe von Lymphozyten, innerhalb der Zellreihe der mononukleären Zellen sind hinsichtlich ihrer regulierenden Funktion immunologischer Prozesse von besonderem Interesse.

Im Nabelschnurblut der Neugeborenen von atopischen Müttern zeigt sich nach Stimulation eine niedrigere Genexpression sämtlicher Treg-assoziiierter Gene. Die Stimulation der CBMCs erfolgte mit Stimuli des angeborenen Immunsystems (LpA und Ppg) und des erworbenen Immunsystems (D und OVA) und mit dem Mitogen PHA.

Signifikant waren die Ergebnisse nach Stimulation mit Ppg und LpA für die Gene GITR (TNFRSF18) und LAG3. Auch bei Stimulation mit Mitogen PHA und Hausstaubmilbe D konnte eine geringere Expression (nicht signifikant) der Treg Marker nachgewiesen werden.

Diese Daten weisen darauf hin, dass sich die mütterliche Atopie bereits intrauterin auf regulierende Faktoren des Immunsystems auswirken kann.

Zusätzlich konnte von der Arbeitsgruppe anhand der Durchflusszytometrie in den CBMCs von Neugeborenen mit mütterlicher Atopie eine geringere Anzahl von regulatorischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Durch Messung der Proliferationsrate wurde deutlich, dass diese bei CBMCs atopischer Mütter erhöht ist; besonders konnte dies unter dem Mitogen PHA aufgezeigt werden, jedoch auch alle anderen Stimuli führten zu einem erhöhtem Stimulationsindex bei mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut atopischer Mütter [CBMCs (A)].

Die signifikanten Daten in Bezug auf die höher ausfallenden Geburtsparameter der Neugeborenen atopischer Mütter und die ebenfalls signifikante Kombination aus mütterlicher und parallel vorhandener väterlicher Atopie zeigte keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker „CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hoch“ regulatorischer T-Zellen.

Die Ergebnisse der PAULINA-Studie zeigen, dass mütterliche Atopie das *intrauterine Milieu* des Neugeborenen beeinflusst, indem die Anzahl und Funktion der regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut gemindert und beeinträchtigt wird und die Expression der mit diesen Zellen in funktionellem und immunologischen Zusammenhang stehenden Gene ebenfalls herabgesetzt wird; diese Resultate lassen vermuten, dass das Vorliegen mütterlicher Atopie die Entwicklung von allergischen Krankheitsbildern bei Kindern fördern könnte, da es Hinweise gibt, dass bereits *pränatale* Reifungsprozesse im kindlichen Immunsystem durch mütterliche Einflussfaktoren moduliert werden können.

**Schlagwörter:** angeborenes (innate) und erworbenes (adaptive) Immunsystem, Atopie, CBMCs, regulatorische T-Zellen, Genexpression.

## Literaturverzeichnis

- Amoudruz, Petra et al. 2005: *Neonatal immune responses to microbial stimuli: Is there an influence of maternal allergy?* The Journal of Allergy and Clinical Immunology 115 (6), S. 1304-1310.
- Andreae, Susanne et al. 2002: Maturation and Activation of Dendritic Cells Induced by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). Journal of Immunology 168, S. 3874-3880.
- Braun-Fahrländer, Charlotte et al. 2002: *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.* The New England Journal of Medicine 347 (12), S. 869-877.
- Buchta, Mark und Andreas Sönnichsen 2003: *Das Physikum.* München/Jena: Urban & Fischer Verlag.
- Carl Roth GmbH + Co. KG 2010: *Zellkultur Multiwell Platten.*  
<http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do;jsessionid=F5F0E95543E652A129E1C8CE95CE5294?id=1926&favOid=000000070002e8b000050023&act=showBookmark&lang=de-de&market=DE>, 02.12.2010.
- Cogswell, J.J. 2000: *Influence of maternal atopy on atopy in the offspring.* Clinical and Experimental Allergy 30 (1), S. 1-3.
- Cooke, Robert und Albert van der Veer 1916: *Human Sensitization.* The Journal of Immunology 1, S. 201 -305.
- Ehrenstein, O. S. von et al. 2000: *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.* Clinical and Experimental Allergy 30, S. 187-193.
- Fontenot, Jason und Alexander Rudensky 2005: A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the fork head family transcription factor Foxp3. Nature Immunology 6 (4), S. 331-337.
- Fritz, Jörg H. et al. 2006: *Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease.* Nature Immunology 7, S. 1250-1257.
- GeneOn GmbH 2011: 96well PCR Platten:  
<http://h1689997361k1.catalogus.de/1689997361/1/AD586/Mjc5OTQ=/586+27994+Axon.html>, 26.08.2010.

- Gomez, Gregorio et al. 2005: *TGF $\beta$ 1 inhibits mast cell Fc $\epsilon$ R1 Expression*. Journal of Immunology 174 (10), S. 5987-5993.
- Hartl, Dominik et al. 2007: Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in pediatric asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 119 (5), S. 1258-1266.
- Holt, Patrick 2004: The role of genetic and environmental factors in the development of T-cell mediated allergic disease in early life. Paediatric Respiratory Reviews 5 (Suppl A), S. 27-30.
- Huang, Ching-Tai et al. 2004: *Role of LAG-3 in Regulatory T Cells*. Immunity 21, S. 503-513.
- Karagiannidis, Christian et al. 2004: *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 114 (6), S. 1425-1433.
- Kavanagh, Brian et al. 2008: CTLA4 blockade expands FoxP3<sup>+</sup> regulatory and activated effector CD4<sup>+</sup> T cells in a dose-dependent fashion. Blood 112 (4), S. 1175-1183.
- Köllges, Ralph (ohne Jahresangabe): *Allergien im Kindes- und Säuglingsalter*. [http://www.daab.de/all\\_saeugallergie.php](http://www.daab.de/all_saeugallergie.php), 01.12.2010.
- Kulkarni, et al. 1993: Transforming growth factor  $\beta$ 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, S.770-774.
- Kuruvilla, A. P. et al. 1991: Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, S. 2918.
- Liebers, V. und M. Raulf-Heimsoth 2003: *Endotoxine - Wirkung und Nachweisverfahren*. <http://www.ipa.ruhr-uni-bochum.de/publik/info0103/endotoxin.php>, 1.12.2010.
- Liu, Jing et al. 2011: TLR 2 polymorphisms influence neonatal regulatory T cells depending on maternal atopy. Allergy 66 (8), S. 1020 – 1029.
- Letterio, John J. und Anita B. Roberts 1998: *Regulation of immune responses by TGF $\beta$* . Annual Review of Immunology 16, S. 137-161.
- Marinic, I. et al. 2006: *Regulatory T cells*. Acta Med Croatia 60 (5), S. 447-456.
- McHugh, Rebecca et al. 2002: *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells*. Immunity 16(2), S. 311-323.

- McInturff, Jamie et al. 2005: The Role of Toll-like Receptors in the Pathogenesis and Treatment of Dermatological Disease. *Journal of Investigative Dermatology* 125, S. 1-8.
- Modlin, Robert mit Hans Brightbill und Paul Godowski 1999: *The Toll of Innate Immunity on Microbial Pathogens*. *The New England Journal of Medicine* 340 (23), S. 1834-1835.
- Müller, Hans-Joachim 2001: *PCR*. Gustav Fischer-Verlag.
- Mutius, von et al. 2000: Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clinical & Experimental Allergy* 30 (9), S. 1230-1234.
- Pingoud, Alfred 1997: *Arbeitsmethoden der Biochemie*, de Gruyter-Verlag, S. 101.
- Prescott, Susan et al. 1999: Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *The Lancet* 353 (9148), S. 196-200.
- Read, Simon et al. 2000: Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25+CD4+Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 192 (2), S. 295-302.
- Schwaab, Eva (ohne Jahresangabe): *Glossar/PCR*. <http://www.humangenetik-online.de/html/glossar.html>, 02.12.2010.
- Shevach, Ethan und Geoffrey Stephens 2006: The GITR-GITRL interaction: costimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nature Reviews Immunology* 6, S. 613-618.
- Stephens, Geoffrey et al. 2004: Engagement of Glucocorticoid-Induced TNFR Family-Related Receptor on Effector T Cells by its Ligand Mediates Resistance to Suppression by CD4+CD25+ T Cells. *The Journal of Immunology* 173, S. 5008-5020.
- Strachan, David 1989: *Hay fever, hygiene, and household size*. *British Medical Journal* 299, S. 1259-1260.
- Strickland, Deborah et al. 2006: Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 12, S. 2649-2660.
- Takeda, Kiyoshi und Shizuo Akira 2001: *Roles of Toll-like receptors in innate immune responses*. *Genes to Cells* 6, S. 733-742.
- Thompson, Claire und Fiona Powrie 2004: *Regulatory T cells*. *Current Opinion in Pharmacology* 4, S. 408-414.

- Velasco, German et al. 2005: *Toll-Like Receptor 4 or 2 Agonists Decrease Allergic Inflammation*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 32, S. 218-224.
- Werner, Monika et al. 2003: *TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 112 (2), S. 323-330.
- Williams, Toby et al. 2000: Fetal and neonatal IL-13 production during pregnancy and at birth and subsequent development of atopic symptoms. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 105 (5), S. 951-959.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Toll-Like-Rezeptoren und Liganden .....	7
Abbildung 2: TLR mit Liganden und Signaltransduktion .....	8
Abbildung 3: Antigenpräsentation durch MHC I und II & T-Zell-Aktivierung .....	11
Abbildung 4: Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Ficollgradienten .....	17
Abbildung 5: Zellkultur in 6-well-Platte (Bildmitte) und Proliferationsplatte (links unten) .....	18
Abbildung 6: Schema der PCR Schritte mit Initialisierung und Denaturierung (1&2) und Annealing & Elongation (3&4); P = Polymerase .....	20
Abbildung 7: Pipettiervorlage für PCR-Platte mit Darstellung der Primer (Position A1-7) und nicht-stimuliertem (M) sowie stimuliertem Ansatz (PHA, LpA, Ppg, D und D+L); NTC als Qualitätskontrolle der Primer. ....	23
Abbildung 8: PCR-Platte (96-well-Platte) .....	23
Abbildung 9: Bandendarstellung in der Gelelektrophorese (Fotoscan): Gene 18S, $\beta$ 2-Mik, FoxP3, GITR, CTLA4, LAG3 und TGF $\beta$ unter Stimulationsbedingung mit PHA, LpA, Ppg, D, D & L [LpA] und ohne Stimulation (M); NTC zur Qualitätskontrolle. ....	25
Abbildung 10: PCR-Amplifikationsgraphen eines Kontrollgens (Zyklus 22-23, 2 Duplikate) und des Primers TGF $\beta$ (Zyklus 27, 1 Duplikat) .....	26
Abbildung 11: PCR-Schmelzkurve eines Kontrollgens (83-84°C, 2 Duplikate) und des Primers TGF $\beta$ (87°C, 1 Duplikat) .....	27
Abbildung 12: Gesamt-Immunglobulin E [IU/ml] im Serum nicht-atopischer (NA, n = 70) und atopischer (A, n = 48) Mütter mit Darstellung des Medians, der 1. und 3. Quartile (Balken) & der 3./97. Perzentile; NA mit einzelnen Ausreißern.....	31
Abbildung 13: Anteil väterliche Atopie .....	31
Abbildung 14: Bildungsgrad Mütter.....	32
Abbildung 15: Stimulationsindex der CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer (A) Mütter nach Stimulation mit Phytohämagglutinin PHA (25. und 75. Perzentile) .....	34
Abbildung 16: Stimulationsindizes der CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer (A) Mütter nach Stimulation mit OVA, LpA, Ppg, D und D&L [LpA] (25. und 75. Perzentile) .....	35
Abbildung 17: Expression von GITR (TNFRSF18) nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer	

Mütter (A) mit signifikant erniedrigten Werten nach Stimulation mit LpA und Ppg (25. und 75. Perzentile) .....	36
Abbildung 18: Expression von LAG3 nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) mit signifikant erniedrigtem Wert nach Stimulation mit Ppg (25. und 75. Perzentile) .....	36
Abbildung 19: Expression von Foxp3 nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) (25. und 75. Perzentile) .....	37
Abbildung 20: Expression von CTLA4 nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) (25. und 75. Perzentile) .....	37
Abbildung 21: Expression von TGF $\beta$ nach Stimulation mit PHA, LpA, Ppg, D, D&L [LpA] in CBMCs nicht-atopischer (NA) und atopischer Mütter (A) (25. und 75. Perzentile) .....	38
Abbildung 22: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (A) und (NA) mit hoher Korrelation von GITR (TNFRSF18) und LAG3 in der Gruppe der NA ( $R^2 = 0,68$ ) nach Stimulation mit PHA; $R^2 =$ Korrelationskoeffizient .....	39
Abbildung 23: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (NA) zwischen GITR (TNFRSF18) und LAG3 nach Stimulation mit Hausstaubmilbe (D); $R^2 =$ Korrelationskoeffizient.....	39
Abbildung 24: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (A) und (NA) zwischen GITR (TNFRSF18) und FoxP3 nach Stimulation mit Hausstaubmilbe D & Lipid A (D+L); $R^2 =$ Korrelationskoeffizient .....	40
Abbildung 25: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (NA) mit hoher Korrelation ( $R^2 = 0,78$ ) zwischen GITR (TNFRSF18) und FoxP3 nach Stimulation mit PHA; $R^2 =$ Korrelationskoeffizient .....	41
Abbildung 26: Signifikante Korrelation des fold difference (Vielfaches) bei CBMCs (NA) mit hoher Korrelation ( $R^2 = 0,64$ ) zwischen LAG3 und FoxP3 nach Stimulation mit PHA; $R^2 =$ Korrelationskoeffizient .....	41



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR-Zyklen .....	24
Tabelle 2:	Probanden-Charakteristika .....	33
Tabelle 3:	Stimulationsindizes der Proliferation bei CBMCs (NA) und (A) .....	34

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromol
18S	Ribosomales Kontrollgen, <i>housekeeping gene</i>
A	Atopie
APGAR	Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe
Bp	Basenpaar(e)
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CBMC	<i>Cord Blood Mononuclear Cells</i> ; mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Oberflächenmolekül
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cpm	<i>Counts per minute</i>
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>Threshold cycle</i> , Schwellenwertzyklus
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
D + L	Dermatophagoides pteronyssinus + Lipopolysaccharid A
D	Dermatophagoides pteronyssinus, Hausstaubmilbe
DEPC	Destilliertes, gereinigtes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ebd	eben da
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FoxP3	<i>Forkhead family transcription factor P3</i>
g	Gramm
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Rezeptor</i>

H1	Histamin 1
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IU	<i>International Unit</i>
LAG3	Lymphozyten Aktivierendes Gen 3
LP	Lymphozytenproliferation
LpA	Lipid A bzw. Lipopolysaccharid A
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
MW	Mittelwert
n	Angabe für eine Anzahl
NA	Nicht-Atopie
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NOD	<i>Nod-Like-Rezeptor</i>
NTC	<i>Non Template Control</i> , Negativkontrolle
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Natriumchloridlösung
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PHA	Phytohämagglutinin
Ppg	Peptidoglykan
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Nährmedium für Zellen
RT	Reverse Transkriptase
SI	Stimulationsindex
β2mik	Beta-2-mikroglobulin

---

SYBRGreen	Fluorophor, fluoreszierende Substanz
TBE	Pufferlösung
TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TH-1	T-Helferzellen der Gruppe 1
TH-2	T-Helferzellen der Gruppe 2
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
TNFRSF 18	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 18</i>
TNFSF18	<i>Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, member 18</i>
Tregs	Regulatorische T-Lymphozyten
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultraviolett

## Danksagungen

Besonderen Dank möchte ich Frau PD Dr. med. Bianca Schaub, Oberärztin für Pädiatrie im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Lindwurmstraße 4, München, für die Vergabe dieser Doktorarbeit an mich, die Betreuung und die Korrektur dieser wissenschaftlichen Arbeit aussprechen. Als Leiterin der Studie PAULINA trug sie durch ihre praktische Erfahrung im experimentellen Teil, als Ansprechpartnerin für fachliche Fragen und durch die Korrektur der von mir verfassten Manuskripte ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Frau Dr. med. Sattler, Gynäkologin und Oberärztin der Universitäts-Frauenklinik Maistrasse, München, und den Ärzten und Hebammen der gynäkologischen Abteilung der Frauenklinik bedanke ich mich sehr für ihre konsequente Unterstützung im Rahmen der Rekrutierung der Nabelschnurblutproben und für die Aufklärungsarbeit, die sie zusätzlich zu ihrer ärztlichen/betreuenden Tätigkeit vor den jeweiligen Geburten gegenüber Müttern bzw. Eltern für die Studie leisteten.

Fachliche Unterstützung in theoretischen Fragen und experimentellem Vorgehen erhielt ich mit besonderem Engagement von Frau Dr. Michaela Schedel, damalige biologische Doktorandin, jetzt promovierte Biologin, wofür ich mich hier sehr bedanken möchte.

Bei den medizinisch technischen Assistentinnen, Isolde Schleich und Gabi Sulski, bedanke ich mich besonders für ihre zuverlässige Unterstützung in allen experimentellen Schritten und organisatorischen Angelegenheiten im Labor.

Meinen ausdrücklichen Dank möchte ich den Probanden der PAULINA-Studie, den Müttern, Eltern und Familien, die sich bereit erklärt haben, Nabelschnurblut für diese Studienarbeit zur Verfügung zu stellen, aussprechen.

# Anhang

## PAULINA-Studie: Informationen für Eltern

---

Bei Fragen können Sie sich jederzeit an uns wenden.

Wir würden uns sehr über Ihre Teilnahme an unserer Nabelschnurblutstudie freuen.

**Studienleitung:**

Prof. Dr. med. Erika von Mutius

**Studienärztin:**

Dr. med. Bianca Schaub

So erreichen Sie uns:

Tel: 089 / 5160-7856

Dr. med. Bianca Schaub



**PAULINA**

**Pediatric  
Alliance for  
Unselected  
Longitudinal  
Investigation of  
Neonates for  
Allergies**

Informationen für Eltern

**Liebe Eltern,**

in den letzten Jahrzehnten erkranken immer häufiger Kinder an Allergien und Atemwegserkrankungen. Die Ursachen dafür sind vielfältig; Umwelt-Einflüsse spielen dabei eine wichtige Rolle. Auch wenn sich diese Erkrankungen oft nicht vor dem 6. Lebensjahr entwickeln, können die ersten Veränderungen im kindlichen Immunsystem bereits beim Neugeborenen im Blut sichtbar sein. Daher ist die Untersuchung von Nabelschnurblut sehr wichtig.

Ziel der Studie **PAULINA** ist es, besser zu verstehen, welche Einflussfaktoren aus der Umwelt allergische Erkrankungen im Kindesalter beeinflussen können.

Die Ergebnisse unserer Studie **PAULINA** sollen dazu beitragen, neue Wege zu finden, in Zukunft betroffene Kinder durch vorbeugende Massnahmen vor Allergien und Atemwegserkrankungen zu schützen.

Mit Ihrer Teilnahme unterstützen Sie unser Vorhaben.

**Darum machen Sie bitte mit!!**

**Wie sieht die Teilnahme aus?**

Zu Beginn der Studie werden wir ein kurzes Interview (von etwa 5 Minuten) durchführen.

Nach der Geburt Ihres Kindes wird aus der vom Kind abgetrennten Nabelschnur, die nicht mehr benötigt wird, Blut entnommen. Die Entnahme von Nabelschnurblut nach der Geburt ist daher für Kind und Mutter völlig unbelastend. Von Ihnen würden wir gerne bei der Routineabnahme Blut zur Allergietestung entnehmen. Zudem würden wir Blut zur evtl. späteren DNA Analyse einfrieren.

**Ihr Vorteil**

Bei der Untersuchung des Blutes Ihres Kindes wird ein bestimmter Teil der Immunantwort untersucht. Bei Nachweis eines, wenn auch sehr selten auftretenden, Immundefektes Ihres Kindes ist es möglich, diese Information an Sie weiterzuleiten, wenn Sie dies wünschen. Über eine spätere Allergie Ihres Kindes können wir derzeit noch keine Aussage machen. Die Ergebnisse Ihres eigenen Allergietests werden Ihnen mitgeteilt.

**Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.**

Eine Ablehnung der Teilnahme hat keinerlei Nachteile für Sie oder Ihr Kind zur Folge. Sie haben jederzeit das Recht ohne Angabe von Gründen von der Studienteilnahme zurückzutreten. Es entstehen keinerlei Kosten oder Risiken für Sie oder Ihr Kind.

**Wie werden meine Daten geschützt?**

Alle erhobenen Daten werden ANONYM (ohne Namen) ausgewertet. Das heisst, die Untersuchungsergebnisse Ihres Kindes erhalten eine zufällige verschlüsselte Nummer. Daher sind alle Daten geschützt.

Die Studie wird durch die LMU München gefördert und wurde von der bayrischen Ethik-Kommission genehmigt.

## Fragebogen für die Mutter

Kinderklinik und Poliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinikum der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig \_\_\_\_\_  
Maximilians-  
Universität \_\_\_\_\_  
München \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Studiennummer: \_\_\_\_\_

### Nabelschnurblutstudie PAULINA Fragebogen für die Mutter

Wir freuen uns, dass Sie an unserer Nabelschnurblutstudie teilnehmen. Bitte kreuzen Sie die folgenden Fragen an. Ihre Antworten werden vertraulich behandelt. Wenn Sie eine Frage nicht beantworten möchten, lassen Sie sie bitte aus.

#### 1. Sind Sie in Deutschland geboren?

- ☐ Ja
- ☐ Nein, ich bin in \_\_\_\_\_ geboren.

#### 2. Welche Staatsangehörigkeit haben Sie?

☐ \_\_\_\_\_

Wir fragen nach der Staatsangehörigkeit, damit wir einschätzen können, welche Bevölkerungsgruppe wir untersucht haben.

#### 3. Welche Staatsangehörigkeit hat der Vater des Kindes?

☐ \_\_\_\_\_

#### 4. Welche Schulausbildung haben Sie abgeschlossen?

- ☐ Hauptschule
- ☐ Realschule
- ☐ Gymnasium
- ☐ Universität
- ☐ Andere: bitte angeben: \_\_\_\_\_

#### 5. Hat ein Arzt jemals eine der folgenden Erkrankungen bei Ihnen diagnostiziert?

- ☐ Asthma
- ☐ Heuschnupfen



- ☐ Neurodermitis
- ☐ Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes, rheumatoide Arthritis.
- ☐ Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche \_\_\_\_\_
- ☐ Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)
- ☐ Weitere: \_\_\_\_\_
- ☐ Nein

**6. Waren Sie während der Schwangerschaft an einer der folgenden Erkrankungen erkrankt?**

- ☐ Asthma
- ☐ Heuschnupfen
- ☐ Neurodermitis
- ☐ Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes, rheumatoide Arthritis.
- ☐ Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche: \_\_\_\_\_
- ☐ Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)
- ☐ Weitere: \_\_\_\_\_
- ☐ Nein

**7. Haben Sie dafür Medikamente eingenommen?**

- ☐ Ja, ich habe \_\_\_\_\_/Tag eingenommen.
- ☐ Nein

**8. Haben Sie während der Schwangerschaft Medikamente eingenommen?**

- ☐ Ja, ich habe \_\_\_\_\_/Tag von der \_\_\_\_\_ SSW (Schwangerschaftswoche) bis zur \_\_\_\_\_ SSW eingenommen.
- ☐ Nein

**9. Hat ein Arzt bei dem Vater des Kindes jemals eine der folgenden Erkrankungen diagnostiziert?**

- ☐ Asthma
- ☐ Heuschnupfen
- ☐ Neurodermitis
- ☐ Nein



**10. Leidet er aktuell an einer der folgenden Erkrankungen?**

- ☐ Asthma
- ☐ Heuschnupfen
- ☐ Neurodermitis
- ☐ Nein

**11. Nimmt er dafür derzeit Medikamente ein?**

- ☐ Ja, er nimmt \_\_\_\_\_
- ☐ Nein

**12. Welche der folgenden Beschreibungen trifft für Sie am ehesten zu?**

- ☐ Ich habe niemals Zigaretten geraucht.
- ☐ Ich habe früher Zigaretten geraucht, und vor Beginn der Schwangerschaft aufgehört.
- ☐ Ich habe aufgehört zu rauchen, seit ich weiß, dass ich schwanger bin.
- ☐ Ich rauche derzeit durchschnittlich \_\_\_\_\_ Zigaretten/Tag.

**13. Ist dies Ihre erste Schwangerschaft?**

- ☐ Ja
- ☐ Nein, ich habe bereits \_\_\_\_\_ Kinder.

**14. Haben Sie jemals eine Fehlgeburt während einer vorangegangenen Schwangerschaft gehabt?**

- ☐ Ja, in der \_\_\_\_\_ Schwangerschaftswoche.
- ☐ Nein

Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

**Studienleitung:**

Prof. Dr. med. Erika von Mutius

**Studienärztin:**

Dr. med. Bianca Schaub

(Tel: 5160-7856)

**Vielen herzlichen Dank**

**für Ihre Zeit den Fragebogen auszufüllen!**

## Einverständniserklärung

### EINVERSTÄNDNIS Zur Nabelschnurblutstudie PAULINA

„Das Immunsystem des Neugeborenen: Charakterisierung des Phänotyps und Funktion  
von Nabelschnurblut im Rahmen von Endotoxinstimulation“

Vor und Nachname der Mutter: .....

Name des Kindes: .....  
(wenn bereits bekannt mit Vorname,  
sonst Nachname)

Anschrift: .....

.....

.....

Telefon: .....

Hiermit erkläre ich/wir mein/unser Einverständnis, an der Studie teilzunehmen. Ich/Wir wurde/n über das Projekt und die Risiken der Teilnahme informiert. Ich/wir bin/sind damit einverstanden, dass bei der Mutter bei der Routineblutabnahme Blut für eine Allergietestung und aus dem Nabelschnurblut nach Entbindung ca. 20-30 ml Blut entnommen werden. Zudem sind wir einverstanden, dass für evtl. spätere Untersuchungen DNA von Mutter und Nabelschnurblut eingefroren wird.

Ich/Wir kann/können diese Einverständniserklärung jederzeit ohne jegliche Folgen widerrufen.

Das Informationsblatt habe ich/wir gelesen und ich/wir hatte/n ausreichend Zeit, diese Entscheidung zu überlegen. Alle meine/unsere Fragen wurden beantwortet. Eine Kopie des Informationsblattes und der Einverständniserklärung habe ich/wir erhalten.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift der Mutter

## Kreissaalinformation

### KREISSAALINFORMATION für Nabelschnurblutstudie PAULINA

**Einschlusskriterien Mutter:**

unkomplizierte termingerechte Geburt

**Ausschlusskriterien Mutter:**

- Schwere Erkrankungen der Mutter, insbesondere Autoimmunerkrankungen
- Antibiotika Therapie im letzten Trimenon der Schwangerschaft
- Fieber unter der Geburt
- Erhöhtes CrP der Mutter ( $> 0.5\text{mg/dl}$ )

Bitte bei Aufnahme der Mutter das Merkblatt, die Einverständniserklärung und den Fragebogen geben (in der Klarsichthülle bei den Kästchen mit Röhrchen). Die unterschriebene Einverständniserklärung (und evtl. bereits ausgefüllten Fragebogen) wieder in der 2. Klarsichthülle bei den Röhrchen deponieren.

**Bitte um Abnahme folgender Röhrchen (im Kästchen präpariert), soweit möglich:****Aus dem Nabelschnurblut:**

1) Zwei bis drei 10ml Serum-Röhrchen weiß (mit Liquemin vorbereitet)

2) EDTA Blut 1ml

**Von der Mutter:**

1) Ein 4.9ml Serum-Röhrchen braun

2) EDTA Blut 1ml

Bitte Röhrchen nach Abnahme ein paar Mal drehen, Kästchen mit Name der Mutter inkl. Geburtsdatum und Uhrzeit beschriften, und **bei Raumtemperatur !!!** stehen lassen.

(Nicht im Kühlschrank!!!!)

Anschließend bitte eine Nachricht über die Geburt mit Zeitpunkt auf Anrufbeantworter hinterlassen: Tel: 01520/5438551

Die Proben werden von uns alle 24 h abgeholt.

Bei jeglichen Fragen stehen wir jederzeit gerne zur Verfügung!

Vielen herzlichen Dank für die Mithilfe!!

PD Dr. med. Erika von Mutius  
Studienleitung

Dr. med. Bianca Schaub  
Studienärztin, AG Allergie/  
Immunologie, Forschungszentrum Kubus  
der Kinderklinik  
(Tel: 5160-7856 oder -2811 über Pforte,  
Funk: 70-9503)

